

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1935-1936

N° 13

Contribution à l'étude de la perméabilité cellulaire :

La pénétration des acides organiques
dans les cellules
de quelques champignons inférieurs

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme de

Docteur de l'Université de Paris

(PHARMACIE)

présentée et soutenue le 30 mai 1936

PAR

JEAN FOURNIER,
*pharmacien,
ex-interne des Hôpitaux.*

JURY

{ MM. LUTZ, *Président.*
BACH, *Professeur.*
MASCRÉ, *Agrégé.*

IMPRIMERIE SAINT-PIERRE — LANGRES

1936



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552209_0001

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1935-1936

N° 13

Contribution à l'étude de la perméabilité cellulaire :

La pénétration des acides organiques
dans les cellules
de quelques champignons inférieurs

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme de

Docteur de l'Université de Paris

(PHARMACIE)

présentée et soutenue le 30 mai 1936

PAR

JEAN FOURNIER,
pharmacien,
ex-interne des Hôpitaux.

JURY { MM. LUTZ, *Président.*
BACH, *Professeur.*
MASCRÉ, *Agrégé.*

IMPRIMERIE SAINT-PIERRE — LANGRES

1936

Personnel de la Faculté de Pharmacie de Paris

ADMINISTRATION

MM. GUÉRIN, *Doyen*, O. ✱, ☉ I.
P. LEBEAU, *Assesseur*, O. ✱, ☉ I.
P. DESPORT, *Secrétaire*, ✱, ☉ I.

PROFESSEURS

MM. GUÉRIN, O. ✱, ☉ I.	Botanique générale.
PERROT, C. ✱, ☉ I.	Histoire naturelle des Médi- caments.
COUTIERE, O. ✱, ☉ I.	Zoologie.
LEBEAU, O. ✱, ☉ I.	Pharmacie chimique.
BOUGAULT, O. ✱, ☉ I.	Chimie analytique.
GORIS, O. ✱, ☉ I.	Pharmacie galénique.
TASSILLY, O. ✱, ☉ I.	Physique.
DAMIENS, ✱, ☉ I.	Chimie minérale.
HÉRISSEY O. ✱, ☉ I.	Chimie biologique.
SOMMELET, ✱, ☉ I.	Chimie organique.
LUTZ, ✱, ☉ I.	Cryptogamie et Microbiologie
FABRE, ✱, ☉ I.	Toxicologie.
LAUNOY, O. ✱, ☉ I.	Professeur sans chaire.

Doyen honoraire : M. RADAIS, O. ✱, ☉ I.
Professeurs honoraires :

MM. BÉHAL, G. O. ✱, ☉ I. et DELÉPINE, O. ✱, ☉ I., membres de l'Institut
et GUERBET, ✱, ☉ I.

CHARGÉS DE COURS

MM. MARC HONNORAT, ✱, ☉ I.	Législation et Déontologie pharmaceu- tiques.
LAUNOY, O. ✱, ☉ I.	Pharmacodynamie.
DELABY, ✱, ☉ I.	Hydrologie et Hygiène.
PICON, ☉ I.	Minéralogie.
BACH, ☉ I.	Microbiologie.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. DELABY, ✱, ☉ A.	MM. MASCRÉ, ☉ I.	MM. BEDEL, ☉ I.
PICON, ☉ I.	FLEURY, ☉ I.	RÉGNIER, ☉ I.
	BACH, ☉ I.	

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. BEDEL, ☉ I., <i>agréé</i> , chargé des T. P. de 1 ^{re} année	Chimie générale.
FLEURY, ☉ I. et RÉGNIER, ☉ I. : <i>agréés</i> , chargés des Travaux de	Chimie analytique.
SOUÈGES, ☉ I.	Micrographie.
LEROUX, ✱, ☉ I.	Physique.
DEVAL, ✱, ☉ I.	Microbiologie.
DELABY, ✱, ☉ I., PICON, ☉ I. et MASCRÉ, ☉ I. : <i>agréés</i> , chargés des travaux généraux de 4 ^e année.	

Bibliothécaire en Chef : M. BERNARD, ☉ I.



A MON PÈRE

je dédie ce travail
en hommage de très vive gratitude

A MA MÈRE

A MA FEMME

A MA FAMILLE, A MES AMIS

A MON MAITRE

D. BACH

professeur agrégé à la Faculté de Pharmacie
Pharmacien des Hôpitaux de Paris
Docteur ès sciences

*en témoignage de reconnaissance
et de fidèle attachement.*

INTRODUCTION

Une cellule quelconque, placée dans un milieu nutritif, ne peut continuer à vivre si elle n'assimile, soit directement, soit indirectement après une dégradation plus ou moins avancée, les substances minérales et organiques qui lui sont nécessaires.

La membrane cellulaire et le protoplasme doivent donc être perméables à ces substances.

D'autre part, certains produits nuisibles, résultant du métabolisme cellulaire, peuvent diffuser au dehors, alors que d'autres substances solubles, au contraire, peuvent s'accumuler à l'intérieur de la cellule et y rester tant que celle-ci conserve son intégrité.

C'est un fait également bien connu que les substances minérales ou organiques se répartissent de façon irrégulière entre les cellules et le milieu environnant. Il suffit d'indiquer la répartition inégale de K, Na, Cl et P_2O_5 entre le sérum et les globules sanguins (HÖBER). De même, comme l'a montré WODEHOUSE (1917), la concentration de K dans *Valonia* est plus grande que dans l'eau de mer, tandis que la répartition de Mg est inverse.

Il ne s'agit donc pas d'une simple diffusion à travers la membrane cellulaire ; nous sommes en présence d'un phénomène beaucoup plus complexe, pour lequel il faut admettre l'action d'autres facteurs pour régler les quantités assimilées et la rapidité de la pénétration.

La perméabilité cellulaire a fait l'objet d'un nombre considérable de recherches.

Bien que ce problème soit pour les biologistes d'une importance primordiale, les premières expériences précises ne datent guère que d'une quarantaine d'années avec les travaux de DE VRIES (1871, 1888, 1889), de JANSE (1887) et de KLEBS (1887).

Sans entrer dans les détails, pour lesquels je renvoie le lecteur à la revue du physiologiste allemand R. HÖBER (1930), je voudrais indiquer ici en quelques mots les théories principales résultant des travaux entrepris.

THÉORIE DE LA LIPOSOLUBILITÉ.

Contenue en principe dans les travaux de L'HERMITE (1855), ébauchée par NERNTS (1890-91), elle fut formulée par OVERTON (1899-1902). Après avoir étudié la pénétration d'un très grand nombre de substances dans les cellules animales et végétales, avec diverses méthodes, il admet que les couches périphériques du protoplasme sont entourées d'une couche de lipoides et que la pénétration d'une substance est fonction de sa solubilité dans ceux-ci, ou plus exactement de son coefficient de partage entre l'eau et les lipoides.

En d'autres termes, les corps liposolubles pénètrent facilement dans la cellule, les autres ne pénètrent pas ; le degré de solubilité conditionne la vitesse de passage.

THÉORIE DE L'ABSORPTION.

Après avoir montré qu'il n'y a pas toujours parallélisme entre la vitesse de pénétration d'une substance dans la cellule et sa solubilité dans les lipoides, TRAUBE (1910-1911) fait intervenir la notion d'activité de surface et propose la théorie de la « *pression de fixation* » (*Haftdruck*).

Le théorème de GIBBS-THOMSON nous apprend que plus une substance est tensio-active, plus elle s'accumule à la surface de séparation solvant-milieu externe, et par suite moins elle est retenue à l'intérieur du solvant : sa « *pression de fixation* » (*Haftdruck*) est donc plus faible.

TRAUBE en déduit de la manière suivante sa théorie de la perméabilité :

A la limite de séparation protoplasme-solution, les substances s'accumulent d'après leur pression de fixation, celles à pression faible atteignant la concentration la plus élevée et inversement. Il en résulte que les substances à pression de fixation peu élevée, plus concentrée à la surface, ont plus de facilité que les autres pour pénétrer à l'intérieur de la cellule.

CZAPEK (1913), à la suite de ses travaux sur l'exosmose du tanin hors des cellules du mésophylle d'*Echeveria*, arrive à des résultats du même ordre. Il montre que l'exosmose se produit pour des solutions isocapillaires, quelle que soit la nature chimique du corps, quand la tension superficielle est abaissée au taux de 68 p. 100 de celle de l'eau.

D'après cet auteur, il se forme à la surface protoplasmique, en

vertu du théorème de GIBBS-THOMSON, une émulsion de particules huileuses ; au contact d'une solution de tensio-activité de 0,68 (en prenant celle de l'eau égale à l'unité), cette couche superficielle est altérée, et permet au contenu cellulaire de s'échapper.

THÉORIE DE LA MEMBRANE « TAMIS DE MOLÉCULES ».

Les cellules, d'après PFEFFER (1873), se comportent à l'égard de beaucoup de substances comme si elles étaient entourées d'une membrane hémiperméable.

TRAUBE, dans une théorie initiale, en explique le fonctionnement en disant que la membrane possède des pores assez grands pour permettre le passage de l'eau et assez petits pour arrêter les molécules dissoutes.

Mais on s'est rendu compte rapidement qu'une théorie aussi simple était bien loin de la vérité et qu'il était nécessaire de faire intervenir d'autres facteurs, tels que potentiel de membrane, tension superficielle, etc...

Les travaux dans cette voie ont été d'ailleurs effectués surtout avec des membranes artificielles dont il est difficile d'admettre l'analogie complète avec la membrane cellulaire vivante.

Cependant RUHLAND et HOFFMAN (1924), ont montré sur *Beggiatoa mirabilis* que l'action plasmolysante de diverses substances est d'autant plus énergique que leur volume moléculaire est plus petit.

Telles sont, exposées brièvement, les trois théories fondamentales. Mais différents auteurs ont émis des hypothèses plus ou moins compliquées se rattachant à une ou plusieurs d'entre elles.

C'est qu'en effet, si chacune d'elles permet d'expliquer de façon satisfaisante un certain nombre de phénomènes, aucune ne suffit à elle seule pour expliquer la pénétration de l'ensemble des éléments indispensables à la vie.

C'est ainsi que la théorie lipoidique, par exemple, ne permet pas d'expliquer le passage de substances dont l'importance est énorme : l'eau, les sels minéraux, les sucres, ou même les amino-acides !

OVERTON, pour l'eau, avait prévu cette critique ; il avait tourné la difficulté en disant que la lécithine peut fonctionner comme lipoïde hydrophile. Mais NATHANSON a montré que si la lécithine est mise à tremper dans l'eau elle devient imperméable aux lipoïdes, ce qui le conduit à émettre l'idée d'une membrane formée d'une mosaïque d'éléments : les uns de cholestérine, les autres de lécithine.

De même les sucres, corps à grosses molécules qui ne sont ni liposolubles, ni tensio-actifs, ne devraient pas pénétrer dans la cellule.

En réalité, alors que les expériences par diosmose montrent une pénétration nulle des sucres et des sels, les expériences par d'autres méthodes et notamment par voie chimique conduisent à des résultats inverses.

C'est ce qui amène HÖBER à penser que le protoplasme posséderait un système de protection lui permettant de retenir les substances indispensables, et le protégeant de l'envahissement des substances étrangères dont l'accumulation serait nuisible. Le fonctionnement de ce système de protection serait intermittent, ce qui permettrait à certains moments l'entrée d'aliments et la sortie de déchets.

En un mot, il y aurait lieu de distinguer, à côté d'une perméabilité purement physique, une perméabilité physiologique qui serait l'apanage du protoplasme vivant.

Bien que l'hypothèse d'HÖBER me paraisse trop finaliste, il est certain qu'elle apporte une solution satisfaisante à un certain nombre de problèmes dont l'explication nous échappe. De toutes façons, il est logique de penser que la pénétration ne se fait pas suivant un mode unique, et que les divers modes : solubilité, absorption et passage à travers un crible plus ou moins compliqué peuvent coexister pour régler la perméabilité des cellules placées dans des milieux aussi complexes que ceux de la nature.

Parmi les substances susceptibles de pénétrer les unes sont des non-électrolytes, les autres des électrolytes.

Pour ces dernières, une question supplémentaire est à envisager : la forme sous laquelle ils pénètrent dans la cellule.

Nous savons, depuis la théorie d'ARRHENIUS, qu'un électrolyte en solution y existe sous deux états : état moléculaire et état ionisé.

La pénétration des électrolytes se fait-elle aux dépens des molécules ou des ions, ou indifféremment de l'un et de l'autre ?

La question a suscité un nombre considérable de travaux et n'est pas encore résolue. Certains auteurs demeurent partisans irréductibles du passage des ions (BROOKS, 1926, 1934), les autres, en plus grand nombre, partisans de la pénétration à peu près exclusive des molécules entières non dissociées (KELLER, 1923, 1933).

D'après la loi de DONNAN, la charge électrique est la même de part et d'autre de la membrane. On n'a d'ailleurs jamais observé de différence, et on voit mal quelle source d'énergie pourrait lui donner

naissance. Le passage des électrolytes ne peut donc se faire que suivant les schémas suivants :

1) Echange d'ions de même signe entre la cellule et le milieu extérieur.

2) Passage à l'état moléculaire.

3) Enfin passage simultané dans le même sens d'ions de signes contraires.

La rapidité très grande de passage des électrolytes faibles par rapport à celle des électrolytes forts a conduit la plupart des auteurs à envisager une perméabilité de préférence aux molécules non dissociées.

Le travail qui suit a été entrepris dans le but d'apporter une modeste contribution à l'étude de ce problème.

Je me suis adressé aux acides organiques, corps peu dissociés, qui, dans une zone de pH restreinte, peuvent être complètement ionisés ou, au contraire, en majeure partie à l'état de molécules non dissociées.

Les travaux antérieurs ont été pour la plupart des études sur la toxicité de ces acides. Mais pour la netteté des conclusions, j'ai préféré, malgré les difficultés soulevées, utiliser la consommation comme test de leur pénétration.

J'ai choisi comme organismes les champignons inférieurs, dont les tendances acidophiles les rendent aptes plus que tous autres à cette étude.

J'ai étudié successivement, en fonction du pH et de la dissociation de ces acides, la consommation des acides oxalique, lactique et acétique, par l'*Aspergillus niger* (Van Thiegh.), l'*Aspergillus repens* (De Barry), le *Penicillium glaucum* (Link), le *Cunninghamella echinulata* (Thaxter).

Qu'il me soit permis d'exprimer ici ma respectueuse reconnaissance à Monsieur le Professeur LUTZ qui a bien voulu me faire l'honneur de m'accepter dans son laboratoire.

Ce travail a été effectué sous la direction de Monsieur le Professeur agrégé BACH, qui fut pendant quatre ans mon maître bienveillant à l'hôpital Tenon ; c'est pour moi un agréable devoir de le remercier des conseils et des encouragements qu'il n'a cessé de me prodiguer.

Que Monsieur le Professeur agrégé MASCRÉ, qui a bien voulu faire partie du jury de cette thèse, veuille bien trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

HISTORIQUE

Les acides organiques forment une série très vaste de composés que l'on rencontre constamment dans la nature. La plupart des plantes vertes en élaborent ; et il est bien connu que de nombreuses moisissures placées sur des milieux convenables, sont capables d'en fournir des quantités qui peuvent être considérables et susceptibles d'un emploi industriel.

Ces composés possèdent également une molécule capable de fournir aux divers organismes une source de carbone qu'ils peuvent utiliser.

L'étude sur les champignons est particulièrement intéressante : ce sont des organismes qui supportent des concentrations élevées en ions H, et qui, par leur tendance marquée à produire ces acides, semblent mieux organisés pour s'adapter à leur présence.

Mais l'étude rationnelle de la nutrition par ces composés était impossible tant que l'on n'a pas su cultiver les moisissures sur des milieux synthétiques de composition parfaitement définie. C'est à PASTEUR (1860), qui le premier, utilisa les milieux artificiels pour la culture des Levures et des Mucédinées, qu'il faut faire remonter cet historique.

Les méthodes, au début, sont encore bien imparfaites.

C'est ainsi que JODIN (1862), remplace dans ses milieux de culture le sucre par la glycérine, les acides tartrique, succinique, lactique, acétique, oxalique. Il obtient de belles cultures, mais il avait laissé pousser sur ces milieux tout ce qui voulait bien s'y développer, sans même en déterminer les espèces.

Si plus tard les méthodes se perfectionnent et si l'organisme est étudié en culture pure, l'espèce n'en est pas toujours déterminée avec précision, et les auteurs se contentent de placer le champignon en présence de l'acide ou de son sel en quantité connue dans un milieu complexe contenant parfois d'autres acides, sans même déterminer le plus souvent l'acidité finale.

Ils trouvent, en général, que les acides sont bien assimilés ; mais on note de nombreux résultats contradictoires.

RAULIN (1869) montre que l'acide tartrique à la concentration de 1 à 83 pour 1000 est favorable au développement de l'*Aspergillus niger*. DUCLAUX (1885) signale que les acides acétique et butyrique ont également une action favorisante.

Mais WEHMER (1892) trouve, en général, une influence néfaste des acides organiques sur la germination, et LESAGE (1896) la confirme avec l'acide acétique et le *Penicillium glaucum*.

Tandis que pour STUTZER (1877), puis NAEGELI (1882) l'acide formique n'est utilisable par aucun champignon, DIAKONOW (1887) avec le *Penicillium glaucum* obtient un bon résultat avec le formiate de potassium comme seule source de carbone.

DUGGAR (1901), contrairement à l'opinion de WEHMER, estime que les acides organiques ont une influence excitatrice sur la germination du *Penicillium glaucum* et de l'*Aspergillus niger*.

Les acides utilisés par les auteurs furent nombreux : acides gras, acides lactique, malique, succinique, oxalique.

Si dans les travaux que j'ai cités pour en montrer les contradictions, les champignons utilisés étaient le plus souvent l'*Aspergillus niger* et le *Penicillium glaucum*, de nombreuses autres espèces ont été également mises en expérience :

Les Levures de bière, par LAURENT (1889), BELJERINK (1893), BOKORNY (1896), SCHUKOW (1896), KAYSER et BOULANGER (1898) qui montrent l'action favorable de divers acides, SEIFURT en 1899 et MEISMER en 1901 qui trouvent une influence nuisible de l'acide tartrique ; par OTTO RIPKE (1910), qui étudie également le comportement de *Mycoderma aceti*, *Monilia candida* et *Oidium lactis*, dans un travail déjà plus précis, mais où il utilise un milieu complexe renfermant avec l'acide de la glycérine et de l'asparagine.

KRÜGER (1894) avec *Prototheca Zopfii* et *P. moriformis*, obtient un beau développement sur un milieu au tartrate d'ammoniaque à la dose de 0 gr. 25 pour 1000.

LABORDE (1896) fait l'étude de l'*Euriotropsis Gayoni*, champignon qu'il découvre sur l'empois d'amidon.

BRUHNE emploie *Hormodendron hordei* ; WEST un *Monilia* ; ARTARI le *Sacharomyces Zopfii*.

RAVIN en 1914 étudie, dans un important travail, la nutrition carbonée à l'aide des acides organiques chez les plantes supérieures, les Algues et les Champignons. Pour ces derniers il utilise comme sujet d'expérience le *Penicillium glaucum* qu'il fait pousser sur un

milieu de RAULIN privé de sucre et d'acide tartrique et additionné de l'acide organique en quantité telle que chacun représente la même acidité. Il dose après culture l'acidité totale, les acides organiques libres et combinés, et l'ammoniaque, ce qui lui permet de tracer les courbes de consommation des acides et les courbes de rendement.

Les acides employés sont les acides succinique, malique, citrique, tartrique et oxalique, dont il classe la valeur nutritive dans l'ordre cité.

Il constate qu'avec les acides bibasiques le sel acide est encore un aliment, tandis que les sels neutres de tous les acides sont inutilisés ; mais ses conclusions manquent de netteté, et pour lui, toxicité et valeur alimentaire sont deux phénomènes inverses.

COUPIN, en 1927-1928, dans une série de notes sur la nutrition carbonée de *Penicillium glaucum* et de *Rhizopus nigricans*, s'attache surtout à trouver un substrat favorable, sans se préoccuper de l'acidité du milieu. Il aboutit à cette conclusion étonnante que seuls dans la série grasse les acides malique et butyrique sont capables de fournir au *P. glaucum*, une source de carbone acceptable.

La question s'est éclairée d'un jour nouveau avec le travail de BACH (1925), sur l'*Aspergillus repens*, qu'il cultive sur des milieux contenant 5 p. 100 de saccharose et le sel ammoniacal de différents acides en proportions variables. L'acidité réelle est déterminée avec précision au moyen de la notation pH. L'application des formules de MICHAELIS permet à l'auteur de connaître, en fonction du pH, la concentration du milieu en acide non dissocié.

L'arrêt de la culture se produit à des pH de plus en plus élevés à mesure que croît la concentration totale en acide. BACH montre qu'à ces différents pH la quantité d'acide non dissocié contenue dans le milieu est sensiblement constante.

Cette dose infertilisante d'acide à l'état moléculaire est comprise entre 0,015 M et 0,027 M par litre pour l'acide acétique. Pour l'acide formique elle se place aux environs de 0,015 M par litre ; pour l'acide propionique entre 0,013 et 0,014 M. L'acide butyrique est sensiblement plus toxique, puisque la dose infertilisante est aux environs de 0,005 M.

Devant des résultats aussi nets, BACH conclut à la toxicité exclusive des molécules non dissociées.

Toutefois l'expérimentation avec l'acide oxalique lui donne des résultats un peu différents, et l'amène à conclure à la toxicité de l'ion oxalate acide, sans pouvoir présumer de l'action de la molécule entière.

Ce qui fait pour nous l'intérêt de ce travail, c'est qu'il montre qu'un même acide peut se comporter à différents pH de façon bien différente. Mais si l'auteur a montré avec précision les conditions de toxicité des acides et s'il a pu la chiffrer, il n'a étudié leur consommation que par un moyen détourné et imprécis : la détermination du pouvoir tampon avant et après culture.

S'inspirant des travaux de BACH, SAKAMURA en 1927, dans une note publiée au Japon, étudie systématiquement en fonction du pH, la consommation de l'acide oxalique par l'*Aspergillus niger*.

En cultivant le champignon sur un milieu contenant une constante minérale et l'acide à la concentration N/8, en présence de NO_3NH_4 comme source d'azote, il constate que, même lorsque tout le glucose est consommé, l'*Aspergillus niger* ne peut plus assimiler l'acide oxalique si le pH est supérieur à 3,5 - 3,6. En calculant, comme l'avait fait BACH, la concentration de l'acide sous forme moléculaire en fonction du pH, il s'aperçoit que précisément à ces pH 3,5 - 3,6, l'acide à cet état disparaît pratiquement de la solution.

Il conclut en ces termes (loc. cit., p. 260) :

« On peut conclure de ces expériences que l'*Aspergillus niger* ne peut consommer l'acide oxalique qu'à l'état moléculaire, et que l'âge du mycélium et la quantité de sucre dans le milieu de culture ne jouent aucun rôle important... Il est évidemment difficile de généraliser la conclusion tirée des expériences sur la consommation de l'acide oxalique par l'*Aspergillus niger*, à d'autres acides et à d'autres champignons. Il est très probable que cette relation entre la consommation et l'état de dissociation d'un acide organique peut être différente selon le champignon et selon l'acide. Les champignons acidophiles, comme l'*Aspergillus niger*, se sont peut-être adaptés de la façon la meilleure dans la nature, à consommer les molécules libres d'acide oxalique, tandis que les champignons peu acidophiles au contraire peuvent être en état de consommer celui-ci à l'état d'ions ».

La question ainsi posée par SAKAMURA change l'orientation du problème.

Les études antérieures ont surtout porté sur la valeur comparée, comme aliment, de différents acides sur différentes sortes de champignons, en faisant intervenir surtout la structure moléculaire de l'acide. Les auteurs indiquaient bien pour la plupart si les acides étaient donnés sous forme d'acides libres ou de sels, mais sans tenir compte de leur état constamment variable dû aux changements de pH au cours de la croissance du mycélium.

Les travaux de BACH et de SAKAMURA mettent en valeur un

facteur plus important encore que la structure moléculaire : le pH du milieu, et par suite l'état moléculaire ou ionisé de l'acide en présence.

L'acide, à l'intérieur de la cellule, règle son état d'ionisation sur le pH du contenu cellulaire. Comme celui-ci ne subit que des variations très faibles, tant que la cellule reste vivante, l'acide qui a pénétré se trouve sous une forme identique quel que soit le pH du milieu externe. La consommation et la toxicité ne peuvent donc dépendre que de la perméabilité ou au contraire de l'imperméabilité de la membrane cellulaire aux acides sous les différentes formes. Il en résulte que la valeur alimentaire et la toxicité ne sont pas, comme il le semblait à RAVIN, deux phénomènes inverses, mais bien deux manifestations d'un même phénomène : la pénétration plus ou moins rapide de l'acide à travers la membrane cellulaire.

C'est sous cet angle que je me suis placé et le problème se résume en ces quelques mots :

L'acide organique pénètre-t-il dans la cellule à l'état moléculaire ou à l'état ionisé ou bien indifféremment sous les deux états ?

*
**

Avant d'aborder l'exposé des résultats expérimentaux, il me semble utile de donner un aperçu des travaux que le sujet a suscités.

Depuis les travaux de DE VRIES, de PFEFFER et d'OVERTON, sur la semi-perméabilité du protoplasme vivant, de nombreux essais ont été faits pour déterminer de façon plus ou moins directe les facteurs qui contrôlent la pénétration des acides dans les cellules.

Alors que pour les acides minéraux la théorie de la dissociation d'ARRHENIUS offre une explication satisfaisante de leur action, il apparaît bientôt que pour les acides organiques le phénomène est tout autre. Ces acides ont une activité plus considérable que ne le voudraient les ions H qu'ils libèrent.

Le phénomène a prêté tout d'abord à de nombreuses controverses du fait de la difficulté de son analyse, avant l'apparition des travaux de SÖRENSEN (1909), de MICHAELIS (1914), de CLARK et LUBS (1917-1922) sur la notion de pH et sa mesure facile dans les milieux utilisés.

Il faut donc distinguer, à ce point de vue, les travaux antérieurs à 1915 où les auteurs ont exprimé leurs résultats en fonction de la concentration moléculaire des acides utilisés, et ceux où l'on a utilisé la notation pH de l'acidité. Dans les premiers on a exprimé, en fonc-

tion de la constante de dissociation de l'acide utilisé, la concentration théorique en ions H, concentration qui en réalité est différente dans les milieux complexes utilisés, par suite du pouvoir tampon des autres constituants.

Les premières notions précises sur la question datent des travaux de KAHLENBERG et TRUE (1896) sur les radicules de *Lupin*.

Ils constatent que les acides minéraux sont très toxiques (HCl à la concentration N/6400, SO_4H_2 N/3200, NO_3H N/3200) et que cette toxicité doit être rapportée uniquement à l'ion H. Mais les acides gras qu'ils étudient ensuite sont également toxiques à des concentrations très faibles (N/1600), fait surprenant si l'on considère leur faible dissociation. Comme d'autre part les solutions des sels alcalins correspondants sont sans action, ils en concluent que l'anion n'est pas la cause de la toxicité et que celle-ci est due aux molécules non dissociées. Un cas particulier intéressant est celui des acides acétiques substitués (acides mono, di, trichloracétiques). Ces acides très dissociés ont une toxicité analogue à celle de HCl ; mais leurs sels alcalins sont également très toxiques, ce qui conduit les auteurs à attribuer ici une action prépondérante aux anions.

Ces conclusions gardent aujourd'hui encore toute leur valeur, du fait que les auteurs ont utilisé des solutions aqueuses pures. La concentration des différents ions n'a donc pas été troublée par d'autres constituants, et les concentrations en ions H, tirées des constantes de dissociation, sont par suite exactes.

Si la toxicité de ces acides représente un moyen commode de suivre leur pénétration à l'intérieur de la cellule, de nombreuses autres méthodes ont été mises en jeu.

La grande variété des travaux m'a obligé pour plus de clarté à diviser cet historique en quatre parties :

- 1) Etudes sur les animaux ;
- 2) Etudes sur les plantes supérieures ;
- 3) Etudes sur les bactéries ;
- 4) Etudes sur les champignons.

I. — Etudes sur les animaux

Dès 1898, KAHLENBERG, puis RICHARDS, étudiant l'action des acides sur les papilles linguales, constatent que si pour les acides minéraux l'action est proportionnelle aux ions H, il n'en est plus de même pour l'acide acétique qui provoque sur la langue une action bien plus forte que ne le faisait prévoir sa faible dissociation.

Plus tard, pourtant, BECKER et HERZOG (1907), dans des expériences analogues, trouvent l'ordre suivant : HCl, NO_3H , acide trichloracétique, acide formique, acide lactique, acide acétique, et acide butyrique ; mais ils n'emploient pas les acides à un même pH.

LÆB (1908-1913), dans une série de travaux sur la parthénogenèse des œufs d'oursins et sur l'héliotropisme des Copépodes, remarque la grande activité des acides organiques — l'acide butyrique tue l'œuf d'oursin 100 fois plus vite que HCl — et se trouve conduit à l'attribuer aux molécules non dissociées de ces acides.

HURWITZ (1910), en plaçant un ver de terre : *Allolobophora foetida*, dans des solutions de divers acides, aboutit à la même conclusion que KAHLENBERG et RICHARDS : à la même concentration en ions H, l'acide acétique est plus actif que les acides minéraux ; il admet que le temps de réponse du ver correspond au temps de pénétration de l'acide jusqu'aux terminaisons nerveuses.

DALES et MINES (1911), avec des muscles isolés de chien, constatent, eux aussi, qu'à une concentration égale en ions H, l'action de l'acide acétique et celle de l'acide malique sont plus fortes que celle des acides minéraux. Ils reconnaissent que cette action n'est pas due à une augmentation de la pression osmotique, mais ils l'attribuent à ce que, dans les solutions d'acides organiques, la quantité d'ions H diminue moins vite à cause de la réserve de molécules non dissociées.

Les cellules colorées par un pigment naturel offraient un moyen commode de se rendre compte de la pénétration, en suivant le virage du colorant sous l'influence de l'acide. Après HARVEY (1914-1914) qui employait le filament gonidien d'une Holothurie : *Stichopus ananias*, et les cellules pigmentées de l'Épinoche, CROZIER (1915-16) étudie la perméabilité aux acides des cellules du bord du manteau d'un Nudibranche : *Chromodoris zebra*. HARVEY pensait que la concentration en ions H, qu'il considère comme le facteur essentiel, n'est cependant pas seule à intervenir, mais CROZIER, au contraire, n'admet qu'elle et critique la théorie de LÆB. Outre que le virage de ces pigments n'est pas très sensible, ils commettent la grosse erreur d'utiliser les acides en solution ayant la même acidité de titration, sans se soucier de la concentration en ions H.

Travaux postérieurs à 1915

A partir de ce moment, les travaux de SÖRENSEN se sont répandus ; l'analyse des phénomènes devient plus serrée à mesure que se perfectionnent les moyens d'investigation.

CROZIER, en 1918, reprend les travaux d'HURWITZ sur *Allolobophora foetida* ; il utilise cette fois les solutions d'acides à la même concentration en ions H, ce qui le conduit à attribuer une activité plus grande aux acides organiques qu'à l'acide chlorhydrique.

Citons, maintenant, les travaux de SCOTT sur la respiration du chat décérébré. Il étudie l'action de CO_2 , le plus simple des acides organiques, qui a retenu, par son importance en biologie, l'attention de nombreux chercheurs. Par ses travaux, l'auteur détruit les théories de la respiration qui étaient alors en vigueur, et montre que l'action de CO_2 non dissocié est telle qu'on peut le considérer comme une véritable hormone respiratoire.

COLLETT (1919) recherche la toxicité de divers acides sur des Infusoires : *Paramecium caudatum*, *Stylonectua pustulata*, *Euplotes patella*, *Vorticella nebulifera*. Il note les différences très grandes de résistance à un même acide des diverses espèces utilisées, ordre de résistance qui varie d'ailleurs avec chaque acide.

Le facteur toxique essentiel lui semble être l'ion H en opérant avec des solutions de même normalité, mais avec des solutions au même pH, il faut en faire intervenir un autre. Dans le cas des acides gras et aromatiques, il s'agirait de l'anion, puisqu'on note une diminution de toxicité lorsqu'un de ces acides est additionné de HCl qui en diminue l'ionisation. Avec *Euplotes* cependant, il se produit le phénomène inverse qui fait supposer que dans ce cas les molécules non dissociées jouent un rôle prépondérant.

Plus tard (1921), il cherche à vérifier ces hypothèses en étudiant spécialement le comportement de *Paramecium* et de *Euplotes*. Il les soumet à l'action des acides seuls puis d'un mélange acide + HCl et acide + son sel de Na. Par addition de HCl à l'acide, il se produit une diminution légère de la toxicité, ce qui indique une action dominante de l'anion ou bien un retard de toxicité des molécules dû à HCl. Les expériences avec le mélange acide + sel conduisent aux mêmes résultats. Toutefois avec *Euplotes* et dans le cas des acides benzoïque, citrique et salicylique, le mélange acide + sel a une activité plus grande que l'acide seul, bien que les sels ne soient pas toxiques ; cela indiquerait dans ce cas une action de la molécule non dissociée.

Mais l'interprétation de ces expériences est délicate, car les organismes utilisés sont extrêmement sensibles aux acides.

PHILIPPSON et HANNEWART (1920) montrent que l'action des acides organiques sur le muscle de grenouille est bien différente de celle des acides minéraux : les premiers amènent un épuisement

rapide, tandis que les seconds ne produisent aucune fatigue musculaire. Les auteurs en rendent responsables les molécules entières et non les anions.

JACOBS, la même année, étudie l'action de CO_2 sur des têtards. sur divers protozoaires et sur les papilles linguales. Pour lui, la pénétration des molécules entières est très importante ; c'est ainsi qu'une solution de CO_2 et CO_3NaH à pH 7,4 produit encore un goût acide sur la langue.

En 1924, SMITH et CLOWES recherchent l'action toxique du même acide sur les œufs d'*Asteria* et d'*Arbacia*. Ils trouvent que pour une même tension de CO_2 l'action diminue lorsqu'augmente la quantité de CO_3NaH présente dans le milieu, ce qui indique que CO_2 libre n'est pas seul à pénétrer. Ils émettent l'hypothèse d'une pénétration soit de CO_3NaH lui-même, comme l'a montré BROOKS (1923) avec l'Algue *Valonia*, soit de l'ion HCO_3^- , puisqu'aux pH utilisés (6-6,5) l'ion $\text{CO}_3 =$ peut être considéré comme inexistant. D'après eux, il est illogique, de toutes façons, d'envisager le passage de CO_3H_2 plutôt que de CO_2 , puisque ce dernier, en tant qu'anhydride, doit avoir une faculté plus grande de pénétration.

SMITH, l'année suivante, avec les mêmes méthodes de travail. étend cette étude à différents acides. Il peut les classer en trois groupes :

Avec un premier groupe, qui comprend les acides carbonique, acétique et propionique, l'auteur observe que lorsque la concentration en anions augmente, il faut pour produire l'arrêt de la division cellulaire, des concentrations plus fortes en acide libre. Il doit donc admettre que les molécules ne sont pas seules à pénétrer et que les ions (CO_3H pour l'acide carbonique) traversent également la membrane puisqu'ils participent à la réaction intracellulaire.

Dans un deuxième groupe : celui des acides lactique et tartrique, la pénétration est nulle sous toutes les formes.

Enfin les acides benzoïque et salicylique forment un troisième groupe où, à l'arrêt de la division cellulaire, la concentration de l'acide est telle qu'elle détermine une concentration constante en molécules non dissociées ; ce qui indique que seules ces dernières peuvent pénétrer.

L'acide cyanhydrique est un acide faible peu dissocié que l'on peut ranger dans les acides organiques. Sa toxicité est bien plus grande pour les animaux que pour les végétaux. Nous devons à BODINE (1925) une étude de son action sur des protozoaires et le

têtard de *Rana fusca*. Pour cet auteur elle est à rapporter aux molécules non ionisées de cet acide qui se dissocient à l'intérieur de la cellule.

LILLIE (1926-1927) recherche la valeur de différents acides pour l'activation artificielle des œufs d'étoile de mer. Il emploie HCl, les acides gras, les acides lactiques, benzoïque et carbonique.

Alors que des acides très dissociés, comme HCl, sont peu actifs, l'acide lactique l'est plus, mais beaucoup moins encore que des acides faibles, peu dissociés comme les acides gras. La courbe des variations du pouvoir d'activation de l'acide acétique suit de très près sa courbe de dissociation. L'addition d'acétate de soude à la solution d'acide acétique, qui produit un recul d'ionisation, en augmente l'activité. Toutefois, aux faibles concentrations, le phénomène n'a plus la même netteté et correspondrait assez bien à une pénétration à la fois de molécules entières et d'ions acétates.

WERTHEIMER (1927), dans une étude générale de la perméabilité de la peau de grenouille isolée et maintenue vivante, note que les acides forts pénètrent difficilement, tandis que les acides organiques la traversent facilement. Il montre notamment que la pénétration de l'acide acétique est plus rapide après addition d'acétate de soude qui recule son ionisation, qu'après addition de NaCl qui ne la change pas, indiquant ainsi une pénétration plus rapide des molécules non dissociées.

JACOBS, la même année, conclut, de ses travaux sur l'hémolyse des globules rouges par les sels ammoniacaux d'acides gras, que ces corps doivent leur action à la perméabilité des globules à l'ammoniaque et à l'acide, tous deux sous la forme moléculaire.

A rapprocher de ces travaux ceux de BODENSKY (1928) qui reprend les études anciennes de FUHNER et NEUBAUER (1907) sur l'hémolyse. Il étudie surtout le mécanisme de la pénétration, mais il considère comme un fait établi la pénétration presque exclusive des molécules non dissociées.

BELEHRADEK et SCHWARZ (1928) constatent que l'action toxique des acides organiques sur divers organismes : *Anguillules* du vinaigre, *Tubifex*, *Daphnie*, et le têtard de *Rana fusca*, est bien plus grande que celle des acides minéraux très dissociés. Ils notent également la résistance très variable des divers organismes à un même acide.

JUCEI (1929) étudie la pénétration des acides dans le tissu cilié d'Attinies : *Sagartia bellis* et *Adamsia rodeletii*. Comme indice de leur action, il choisit la durée de persistance du mouvement ciliaire à partir de l'immersion dans le milieu d'expérience.

Pour les acides minéraux, la durée est inversement proportionnelle à la concentration en ions H de la solution. Mais pour les acides organiques (acide acétique), la question est plus complexe ; outre les molécules indissociées dont le passage est rapide, il faut envisager également la pénétration dans les tissus, avec une vitesse réduite, des constituants des sels.

TAYLOR (1928) reprend, avec un protocole expérimental bien précisé, les travaux antérieurs sur le goût des acides ; il constate la perméabilité facile des molécules non dissociées.

En 1930, seul, puis en collaboration avec FARTHUNG et BEERMAN, le même auteur cherche à vérifier la théorie d'OVERTON ; mais il émet à la base de ses expériences ces deux hypothèses :

que seuls passent les molécules entières non dissociées ou les ions qui se sont réunis avant leur passage ;

que l'effet à l'intérieur de la cellule est dû aux ions provenant de la dissociation de ces acides.

STEWART, en 1931, mesure la perméabilité des œufs d'*Arbacia* pour les sels d'ammonium des 5 premiers acides gras ; il détermine pour cela l'augmentation du volume de l'œuf placé dans la solution en expérience. En classant les sels d'après leur vitesse de pénétration, il obtient l'ordre suivant : valérianate, butyrate, propionate, acétate, formiate. L'auteur conclut de ses travaux que seules pénètrent les molécules non dissociées d'acide et d'ammoniaque, formées en quantité équivalente par hydrolyse du sel correspondant.

Pour terminer, notons, enfin, que, d'après HUGOUNENQ et FLORENCE (1928), c'est probablement à la propriété des cellules d'être plus perméables aux molécules indissociées qu'aux ions qu'on doit relier le fait qu'au point de vue pharmacologique les corps à fonctions acides libres ont des propriétés en général peu caractéristiques et atténuées, et que pour exalter ces propriétés, il suffit d'éthérifier la fonction acide, c'est-à-dire l'annuler au point de vue de la dissociation électrolytique. Ainsi la benzoyl-ecgonine, qui a un carboxyle ionisable, n'est pas analgésique, bien que cette propriété soit supportée en propre par le radical benzoyl-ecgonine ; mais il suffit d'éthérifier le COOH par un groupement méthyle (cocaïne) pour faire apparaître la propriété analgésique.

II. — Etudes sur les plantes supérieures

Après KAHLENBERG et TRUE (loc. cit.), HEALD, la même année, étend l'étude de la toxicité à diverses plantes : *Pisum sativum*, *Zea mays*, et *Curbita pepo*, sur lesquelles il fait agir une série d'acides

minéraux et l'acide acétique. Tout en constatant la grande activité de l'acide acétique, il s'attache surtout à montrer la sensibilité très variable de ces différentes plantes.

KAHLENBERG et AUSTIN (1900) notent comme leurs prédécesseurs que l'action des acides organiques ne peut s'expliquer en ne tenant compte que des ions H. La même année, TRUE reprend les études sur les radicules de *Lupin*, en employant des solutions diluées d'acides variés. Il aboutit aux mêmes résultats que quelques années auparavant : avec les acides minéraux, l'effet est dû aux ions H ; avec les acides organiques, la molécule non dissociée joue un rôle important ; les anions en général sont relativement peu toxiques.

La toxicité de la molécule non dissociée est signalée également par FISHER (1907) qui observe que les acides gras sont toxiques pour les graines aquatiques en germination à une concentration où les acides minéraux sont favorables ; elle est signalée également par RUFZ DE LAVISON (1911).

HARVEY (1911) remarque que les cellules des plantes ne possèdent pas de pigments assez sensibles aux acides et en détermine la perméabilité à l'aide d'un artificiel : il les colore avec un colorant vital, le rouge neutre, et note le virage du colorant qui témoigne de la pénétration de l'acide. Mais il emploie des solutions d'acides à la même normalité (O,01 N), sans tenir compte de leur degré différent de dissociation. Il obtient les mêmes résultats qu'avec le filament gonidien de *Stichopus ananus*, résultats confirmés par CROZIER avec *Chromodoris* : les acides minéraux pénètrent plus vite que les acides organiques.

Ces résultats sont entachés d'une erreur supplémentaire, du fait que le rouge neutre vire mal aux acides, et, qu'au moment du virage, l'intégrité de la cellule n'est pas sûrement conservée.

Travaux postérieurs à 1915

HAAS (1916) utilise des cellules pigmentées naturellement : les pétales de *Bégonia* et la racine de *Chou rouge*. Il attire l'attention sur le fait que l'ordre de pénétration n'est pas le même si l'on considère des solutions de même normalité ou au contraire de même pH. Dans le premier cas, on retrouve les résultats de HARVEY et de CROZIER ; dans le second cas, l'acide acétique qui pénétrait le moins vite, passe en tête de la série.

COMPEL (1925) étudie la plasmolyse des cellules d'*Ulva lactuca*. Il conclut que pour les acides minéraux la pénétration dépend de la concentration en ions H, et que les acides organiques pénètrent beaucoup plus vite que les acides minéraux.

A côté de ces travaux, se placent les belles recherches de l'école américaine.

Dans un premier travail, étudiant la pénétration de H_2S dans une algue, *Valonia*, OSTERHOUT (1926) constate que la courbe de pénétration suit de très près la courbe de dissociation de cet acide.

L'année suivante, avec DORCAS, il montre que la pénétration de CO_2 se fait d'une façon analogue, et qu'on doit la rapporter presque exclusivement aux molécules non dissociées.

En 1930, il établit avec JACQUES que cette pénétration en fonction du temps est représentée par une courbe du premier ordre, de la forme $K = \frac{1}{t} \log. \frac{a}{a-x}$. Il montre en outre que dans des solutions

de pH 6 et 7, avec des quantités égales dans les deux cas de molécules entières de CO_2 , la pénétration est la même, aux erreurs d'expériences près, établissant ainsi qu'elle se fait seulement sous la forme de CO_2 non dissocié et non d'ions CO_3H^- ou $CO_3=$, puisque dans ces expériences la quantité d'ions a pu être changée très largement sans changer le taux de pénétration.

BRINLEY (1927), en étudiant l'action de HCN sur les cellules des feuilles d'*Elodea* et les poils de la racine de *Limnobia Sinclari*, aboutit à des conclusions analogues : l'action toxique de cet acide est étroitement proportionnelle à la quantité de ses molécules non ionisées.

IRWIN, la même année, étudie l'action de tampons acétate sur la pénétration du bleu crésyl dans le protoplasme de l'algue *Nitella*. Il constate que leur action ne peut s'expliquer qu'en admettant, soit une action spécifique sur le protoplasme, soit une pénétration à l'état de molécules entières qui se dissocient à l'intérieur du protoplasme.

BOUILLENNE (1930) recherche le mode de pénétration des sels ammoniacaux de divers acides dans les cellules de *Tradescantia virginica* et d'*Allium cepa*. Il constate que les électrolytes pénètrent dans la cellule, bien que très lentement, ce qui contredit l'hypothèse formulée par OSTERHOUT que seules les molécules entières sont capables de traverser la membrane. D'autre part, tous les sels d'acides organiques employés : formiate, acétate, propionate, butyrate et valérianate, pénètrent en solutions neutres à une vitesse proportionnelle au poids moléculaire de l'acide.

Enfin, en 1931, R. COLLANDER O. TURPEIMEN et E. FABRITIUS montrent que dans les cellules de *Rhæo discolor*, l'acétate d'ammoniaque pénètre à l'état d'ammoniaque et d'acide acétique, tous deux sous la forme moléculaire.

III. — Etudes sur les bactéries

Les bactéries sont des organismes très sensibles aux ions H, ce qui réduit beaucoup le champ d'investigation. C'est pourquoi on ne trouve guère dans la littérature que des travaux sur la toxicité des acides.

En 1897, PAUL et KRÖNIG constatent avec *Bacillus anthracis* et *Staphylococcus aureus* une parenté entre l'action des acides et la quantité d'ions H libres. Ils attribuent les nombreuses exceptions qu'ils rencontrent à une toxicité particulière de l'anion.

Mais WINSLOW et LOCHRIDGE (1906) montrent avec le bacille typhique et le coli-bacille, que si pour les acides minéraux l'action est due aux ions H, il n'en est plus de même pour les acides organiques, pour lesquels il faut faire intervenir une toxicité particulière des molécules non dissociées.

PAUL, BIRSTEIN et REUSS (1910) émettent la même opinion, et pour eux l'anion aurait plutôt une action favorisante.

Travaux postérieurs à 1915

NORTON et HSU (1916) trouvent dans l'action de l'acide formique sur le bacille typhique, un pouvoir antiseptique proportionnel à la concentration en ions H et en anions. Ils emploient, il est vrai, des solutions qu'ils appellent « isohydriques », dont ils calculent toutes les données sans les baser sur l'expérimentation ; et dans ces conditions, il n'est pas invraisemblable de penser que quelques erreurs aient pu se glisser dans leurs calculs. Quoi qu'il en soit, ils constatent qu'en ajoutant à une solution d'acide formique une solution isohydrique de formiate d'ammoniaque, alors que d'après leurs calculs la quantité d'ions H ne varie pas, ni celle des molécules non dissociées, l'action antiseptique est notablement accrue, fait qu'on doit rapporter à l'augmentation de la quantité d'anions.

WOLF et HARRIS (1917) voient avec *Bacillus perfringens* et *Bacillus sporogenes*, une action proportionnelle au pH ; ils notent, cependant, une certaine influence des anions et des molécules non dissociées.

WIETH (1918) confirme cette opinion avec le Coli-bacille.

VAN DAM (1918) recherche l'action de l'acide lactique sur la fermentation du lait par le bacille lactique. Il note d'abord que le lactate est sans action. Mais en ajoutant des quantités croissantes de lactate au lait en expérience, il constate que la fermentation s'arrête à des pH de plus en plus élevés, ce qui exclut l'hypothèse d'une action

spécifique des ions H. Ces pH sont tels qu'ils déterminent à la fin de l'expérience une concentration en molécules non dissociées d'acide lactique identique dans tous les cas, attestant une action prédominante de celles-ci.

COHEN et CLARK (1919) signalent que l'acide acétique est un antiseptique plus puissant que HCl.

AUBEL (1920) étudie le pouvoir stérilisant des acides sur le bacille pyocyanique ; il note qu'il n'y a pas d'action prépondérante des cathions, et que la nature de l'acide joue un rôle important.

En 1921, TRAUBE et SOMOGYI signalent que l'acide caprylique, bien que peu dissocié, tue plus facilement que HCl et SO_4H_2 le Staphylocoque et le Coli-bacille.

HILL (1929) étudie la pénétration des sels ammoniacaux dans les bactéries lumineuses et conclut à la pénétration des molécules entières de l'acide et de l'ammoniaque.

Enfin, en 1932, BACH publie une étude sur l'action antiseptique des acides gras et de l'acide lactique sur un grand nombre de bactéries. Il attire d'abord l'attention sur le fait que, s'il est exact que l'addition de son sel à un acide en diminue la dissociation, une augmentation de la concentration globale peut masquer cette diminution ; ce fait est très important et, faute d'en tenir compte, nombre d'auteurs ont été conduits à des erreurs d'interprétation.

Avec l'acide lactique, il obtient l'arrêt de la croissance pour des quantités constantes d'acide à l'état moléculaire. L'étude est cependant gênée pour les solutions les plus diluées, par la résistance faible des bactéries aux ions H. Avec l'acide formique, le phénomène est le même aux faibles concentrations, mais pour de fortes teneurs en acide, il y aurait lieu de faire intervenir une certaine toxicité de l'ion formiate. Avec les acides acétique, propionique et butyrique, par contre, l'action s'expliquerait de façon satisfaisante sans faire intervenir les anions.

L'auteur note également les différences énormes de résistance des diverses espèces à un même acide.

IV. — Etudes sur les champignons

L'étude sur les Champignons est plus aisée, parce que ce sont des organismes relativement peu sensibles aux ions H. puisqu'ils ne se développent bien, pour la plupart, que dans les milieux acides : des espèces comme l'*Aspergillus niger* ou l'*Aspergillus repens* se développent encore à pH 1,4.

Mais, comme pour les bactéries, les recherches ont porté sur la

toxicité des acides, qui offrait, outre l'intérêt théorique, un intérêt pratique pour leur emploi comme antiseptiques.

La grande résistance des spores aux acides est signalée déjà en 1898 par STEVENS qui cultive 6 espèces en goutte pendante.

CLARK (1899) le signale également. Mais, dans son travail, on trouve de plus un des premiers essais sérieux de calcul des parties non dissociées des acides, auxquelles il attribue la toxicité ; il manque, malheureusement, de précision dans l'exposé de ses conditions d'expériences.

BIAL (1902) ne voit, au contraire, que l'influence des ions H.

HENNEBERG (1906) constate une toxicité très grande de l'acide formique, mais il ne précise pas ses conditions d'expériences.

A. LE RENARD (1909) voit dans l'action des acides organiques sur le *Mucor mucedo* une influence autre que celles des ions H. De même REICHEL (1911) signale que l'acide acétique est plus toxique que HCl pour le *Penicillium glaucum*.

KIESEL (1913) étudie l'action de divers acides sur l'*Aspergillus niger*, cultivé sur milieu de RAULIN. Il note que leur toxicité ne correspond pas à leur activité chimique ; les acides gras, quoique peu dissociés, sont très actifs. Mais son travail manque de netteté, du fait que le milieu de culture renfermait déjà de l'acide tartrique.

HAGGLUND (1914) confirme l'opinion de BIAL d'une toxicité due uniquement aux ions H.

Travaux postérieurs à 1915

EULER et HEINTZE (1919), après JOHANNESSEN (1912), constatent que les acides faiblement dissociés sont très actifs sur les levures.

SOMOGYI (1921) arrive, à la suite de ses recherches sur la fermentation, à des conclusions identiques : les acides organiques de la série acétique sont plus actifs pour inhiber la fermentation que les acides minéraux.

THIEL et WEIS (1920) étudient la germination des téleutospores de *Puccinia graminis*, et remarquent que l'acide acétique possède un effet stimulant prononcé que l'on ne peut rapporter aux ions H.

WATERMAN (1924) cultive *Penicillium glaucum* sur un milieu contenant l'acide organique comme seule source de carbone. Il conclut à l'effet dominant des ions H, mais il calcule leur nombre au lieu d'en faire la mesure directe, sans tenir compte de l'effet tampon des autres constituants du milieu.

HAGGLUND et AUGUSTSON (1925) constatent au contraire une grande toxicité de l'acide acétique libre sur les Levures.

DUNN (1926) cultive *Sclerotinia cinerea* en présence de plusieurs acides et de leurs sels de sodium. Alors que pour les acides minéraux l'ion H est le seul facteur de toxicité, il faut pour les acides organiques, faire intervenir la molécule entière ; cependant l'anion butyrique pourrait être toxique.

KATAGIRI, la même année, montre que les acides formique et acétique agissent sur la fermentation de telle sorte qu'elle augmente, à pH constant, quand la concentration en acide libre diminue, et qu'à concentration égale en acide libre la fermentation est indépendante de la concentration totale de l'acide ; ce qui ne peut s'expliquer qu'en faisant intervenir une influence prépondérante des molécules non dissociées.

Enfin, je rappellerai ici les travaux de BACH et de SAKAMURA, dont j'ai parlé plus haut et qui ont servi de base à mes recherches.



Cet historique, qui n'a pas la prétention d'être complet, témoigne cependant de l'importance de la question, par le nombre des auteurs qui se sont occupés, de façon plus ou moins directe, de la pénétration des acides organiques dans les cellules d'organismes les plus variés.

Les conclusions, souvent contradictoires, montrent que le phénomène est complexe et son analyse difficile.

Une chose frappe cependant qui a été signalée par un grand nombre d'auteurs, c'est la différence énorme de sensibilité de divers organismes, même très voisins.

Les méthodes employées ne permettaient pas toujours une bonne interprétation des faits. L'emploi de sujets très sensibles aux ions H, par exemple, rend difficile l'appréciation de la toxicité dans les différents cas. Mais surtout, l'intégrité de la cellule n'était pas toujours prouvée de façon absolue : fait très important car la perméabilité est différente chez les cellules vivantes et chez les cellules mortes où la membrane perd, entre autres, son héli-perméabilité.

L'étude de la consommation des acides est, à ce point de vue, la méthode de choix, puisqu'elle permet de contrôler l'intégrité de la cellule par sa manifestation essentielle.

LES METHODES D'ETUDES

I. — Les organismes étudiés

Les espèces que j'ai utilisées pour ce travail proviennent de la Mycothèque de la Faculté de Pharmacie de Paris.

Ce sont : l'*Aspergillus niger* (Van Tieghem),
l'*Aspergillus repens* (De Barry),
le *Penicillium glaucum* (Link)
et le *Cunninghamella echinulata* (Thaxter).

Le choix de ces espèces est la résultante de deux idées directrices :

Réunir des espèces dont les affinités physiologiques soient entre elles les plus différentes possible, mais qui soient, cependant, susceptibles de fournir sur des milieux appropriés, des voiles solides et bien formés, condition nécessaire à la bonne marche de mes expériences.

Aspergillus niger.

Isolé par VAN TIEGHEM en 1867, il a été l'objet de tant de travaux que je me dispenserai ici d'en donner une description détaillée.

Organisme particulièrement résistant aux ions H, il donne sur milieux sucrés une culture qui débute au bout de 24 heures sous forme d'un voile blanc qui se couvre bientôt de conidies noires envahissant rapidement toute la surface du mycélium.

Les conidiophores, dressés au-dessus des hyphes végétatives, mesurent de 0,02 à 0,04 mm. ; ils sont terminés par une ampoule qui porte des stérigmates primaires suivis de stérigmates secondaires terminés par de longues chaînettes de conidies de 5μ environ, recouvertes d'une substance cireuse qui rend difficile leur émulsion.

Dans les milieux voisins de la neutralité il sécrète un pigment de couleur brune.

Il pousse dans des conditions très larges de température ; sa température optima est de 30°.

Aspergillus repens.

DE BARY a, le premier, distingué dans les *Aspergillus* verts deux espèces, *glaucus* et *repens*, qui se différencient par les dimensions des ascospores, celles-ci étant plus grande pour *glaucus* que pour *repens*.

Les périthèces sont de couleur jaune et atteignent 100μ de diamètre. Les conidies sont lisses ou verruqueuses, de dimensions assez variables. Les conidiophores sont également variables.

Ce champignon donne sur un milieu sucré une culture débutant le deuxième jour sous forme d'îlots qui se réunissent en un voile blanc compact qui passe au jaune d'or vers le sixième jour. Le pigment jaune n'est pas uniquement localisé sur les périthèces, mais également sur les hyphes mycéliennes. Le mycélium se couvre ensuite de conidies vertes qui lui donnent un aspect moucheté. Le milieu de culture est coloré par un pigment jaune fluorescent qui vire au brun lorsque le pH du milieu de culture est voisin de la neutralité.

Sa température optima est aux environs de 25° .

Penicillium glaucum.

Cette espèce a été découverte par LINK en 1809, qui a proposé le genre *Penicillium* pour trois espèces : *glaucum*, *candidum* et *expensum*. Mais en 1824 LINK réunit les *Penicillium* verts sous la même dénomination de *Penicillium glaucum*, d'où il est résulté, comme l'a montré THOM, une confusion qui s'est maintenue longtemps.

Ce champignon donne sur milieu sucré des mycéliums denses de teinte jaunâtre à surface grossière et rugueuse, s'étendant lentement et possédant une odeur forte.

L'appareil conidien a la forme d'un pinceau (*penicillus*) ; il est garni de conidies petites de couleur verte.

Il pousse bien en anaérobie en fournissant en quatre jours des périthèces blanches, sans conidies.

Sa température optima se place aux environs de 22° .

Cunninghamella echinulata.

Ce champignon, appartenant aux Mucorinées, a été étudié pour la première fois par THAXTER en 1903, qui lui attribue provisoirement une place dans le genre *Cunninghamella*. Les études de MATRUCHOT (1903) ont montré que c'était bien une Mucorinée : il peut,

en effet, servir d'hôte au *Piptocephalis Tieghemiana* qui vit en parasite uniquement sur les champignons de ce groupe. BLAKESLEE (1905) l'a confirmé en découvrant les zygospores.

Cette moisissure, blanche, se cultive très bien sur tous les milieux usuels. Elle forme un mycélium rampant portant des rhyzoïdes très ténus. Les conidiophores sont dressés, renflés en tête et munis de conidies. Quelquefois, dans les cultures vigoureuses, la tête renflée au lieu de donner des conidies produit des tubes secondaires qui peuvent se terminer par des têtes ou se ramifier encore.

Les conidies de couleur blanc grisâtre sont nombreuses, spinulées et assez grosses : 18μ .

Le mycélium se développe d'abord sous forme de couche mince glaireuse qui s'épaissit et devient sèche. Le développement commence dès le deuxième ou troisième jour et au bout de 6 à 7 jours on obtient un voile épais, cotonneux, de couleur blanc grisâtre.

II. — Milieux et méthodes de culture

J'ai pratiqué les cultures en milieux liquides, les seuls qui me permettaient un dosage facile des acides mis en expérience.

J'ai utilisé exclusivement pour la préparation des milieux des produits purs « pour analyse », de POULENC.

La composition de ces milieux a varié avec chaque champignon utilisé ; et je la donnerai au moment de l'étude de chacun d'eux.

L'aliment carboné a toujours été l'acide organique soit seul, soit associé au glucose. La source d'azote a été suivant les cas NO_3NH_4 , NO_3K , ou le glycocolle.

A) Détermination de la concentration en ions H.

J'ai utilisé l'électrode à quinhydrone de BILLMAN avec des vases poreux d'ATEN à diaphragme en alundum ; le liquide de liaison était constitué par une solution de KCl 3,5 N. Les vases poreux d'ATEN constituent le dispositif le plus sûr pour éliminer les potentiels de diffusion sans augmenter sensiblement la résistance de la pile. Mais ils doivent dans ce but, être maintenus dans un état parfait de propreté. Ils étaient traités après chaque expérience par le mélange chromique pendant 24 heures, puis rincés plusieurs fois à l'eau distillée.

L'appareil de mesure était le potentiomètre de POULENC, associé au galvanomètre à spot du même constructeur, comme instrument de zéro.

Ce dispositif donne des résultats exacts pour une zone allant de pH 1 à pH 10, zone largement suffisante pour mes expériences dans lesquelles le pH est rarement monté au-dessus de 7.

Une précaution importante consiste à ne pas filtrer les liquides dont on veut déterminer le pH. En effet les filtres ordinaires du commerce sont alcalins et peuvent causer des erreurs importantes par excès ; tandis que les filtres à analyse, dits filtres sans cendres, cèdent toujours un peu d'acide et causent des erreurs par défaut.

B) Courbe de neutralisation des milieux.

Bien que le pH ait été pris électriquement avant et après culture, il était commode pour connaître, tout au moins de façon approximative, la réaction des milieux utilisés, d'en déterminer les courbes de neutralisation.

Le milieu, qui ne comporte pas d'effet tampon uniforme, ne doit pas être dilué au cours de cette opération. J'ai donc préparé un milieu double, et 5 cc. de ce milieu ont été amenés à 10 cc. avec un volume connu variable d'alcali ou d'acide titré et de l'eau distillée. Le pH des diverses solutions ainsi obtenues a été mesuré à l'aide de l'échelle colorimétrique de CLARK et LUBS. On construit la courbe de neutralisation en portant en abscisse la quantité de liqueur titrée utilisée et en ordonnée le pH obtenu.

C) Stérilisation des milieux.

Les milieux ont été stérilisés à l'autoclave à 110° pendant 15 minutes. Dans ces conditions ils ne subissaient qu'un changement peu appréciable : à peine y avait-il dans les milieux voisins de la neutralité une légère caramélisation du glucose qui ne pouvait nuire à mes expériences.

Je n'ai pas utilisé la méthode préconisée par SAKAMURA (loc. cit.) qui consistait à stériliser séparément les solutions des différents composants du milieu et à les mélanger ensuite aseptiquement en proportions convenables. Ce procédé est en effet malcommode et risque d'amener des déboires par suite de contaminations accidentelles.

D) Les conditions de culture.

1) MÉTHODE DE CULTURE DIRECTE.

C'est la méthode utilisée par la presque totalité des expérimentateurs. Je ne l'ai utilisée que pour les recherches avec l'acide oxalique.

On ne peut suivre la marche d'une culture de Mucédinée en prélevant de temps en temps une quantité déterminée de liquide, parce qu'on modifie le rapport existant entre le volume du milieu et la masse du champignon. Il est donc indispensable d'ensemencer plusieurs fioles à la fois et de les retirer successivement. Mais il est alors nécessaire de s'attacher à réaliser des conditions identiques dans tous les vases. Dans ce but, les vases ont été choisis de même verre, de même forme, et ensemencés avec la même quantité de spores.

Les milieux à la dose de 25 cc., sont répartis dans des fioles coniques de 150 cc. en verre Pyrez et stérilisés à l'autoclave comme il a été dit plus haut. Ils sont ensuite ensemencés avec 3 gouttes d'une émulsion de spores faite à raison de 10 anses de platine de spores pour 10 cc. de sérum physiologique. Dans le cas de l'*Aspergillus niger* il est bon, pour faciliter l'émulsion des spores qui sont recouvertes d'une couche cireuse, d'ajouter 1 goutte de solution de NaOH N aux 10 cc. de sérum physiologique.

Les cultures sont faites à l'étuve à la température optima pour chaque champignon.

Les semences étaient conservées sur carotte dans des tubes à pomme de terre, et maintenues vigoureuses par des repiquages fréquents.

2) MÉTHODE DE CULTURE INDIRECTE.

Si avec l'*Aspergillus niger* et l'acide oxalique la méthode précédente était applicable, bien qu'elle présente un certain nombre d'inconvénients, avec d'autres acides et d'autres champignons elle soulevait des difficultés presque insurmontables qui m'ont contraint pour les éviter à employer une autre méthode.

A cet effet, je me suis servi d'une méthode appelée : « Méthode des voiles solides », qui a fait récemment l'objet d'une publication, de BACH (1934). Voici en quelques mots en quoi elle consiste :

Le mycélium, obtenu à partir de la spore sur un milieu convenable, est privé du milieu initial par des lavages aseptiques à l'eau distillée stérile ; on introduit au-dessous une quantité déterminée d'un nouveau milieu sur lequel on veut faire réagir le champignon.

Elle fut conçue et utilisée pour la première fois par LUTZ en 1903. Le dispositif utilisé par cet auteur consiste essentiellement en une fiole d'Erlenmeyer dont le fond porte une excavation hémisphérique. Quatre tubes bouchés de coton traversent le bouchon de cette fiole : deux aboutissent à l'excavation et servent à l'introduction et à l'extrac-

tion des liquides de culture ; un troisième s'arrêtant à mi-hauteur, et de gros calibre, sert à l'ensemencement ; le quatrième enfin est relié à une poire destinée à établir une suppression pour évacuer le liquide de la fiole.

Un tel dispositif, ingénieux et commode, pour des recherches qualitatives que lui demandait LUTZ, se prête difficilement à des recherches quantitatives et en série pour lesquelles je voulais l'utiliser : chaque fiole exige pour sa manipulation un support spécial ; l'introduction d'un volume exact de milieu d'étude, et surtout sa récupération totale sont assez compliquées.

Bien plus tard, d'autres auteurs : KOSTYCHEW et TSWETKOVA (1921), BERNHAUER (1928), TAMYA (1928), ont également utilisé cette méthode, mais avec des conditions expérimentales mal précisées ou trop compliquées.

Bien qu'elle exige encore un certain nombre de précautions, BACH a le mérite de l'avoir rendue d'un emploi plus facile que ses prédécesseurs. J'ai, toutefois, apporté quelques légères modifications à la technique détaillée par cet auteur.

CONDUITE DES OPÉRATIONS :

a) *Obtention du mycélium.*

Je me suis servi comme vases à expériences de fioles d'Erlenmeyer en verre de Bohême, de 250 cc. de capacité : matériel moins encombrant pour le travail en série que les fioles à tubulure latérale décrites par l'auteur.

Le liquide de culture initial était réparti dans chaque fiole à la dose de 50 cc. Sa composition a varié avec chaque champignon. Mais d'une façon générale, il est nécessaire pour obtenir des voiles non gaufrés, d'employer des milieux plus dilués que les milieux usuels.

Après la stérilisation à l'autoclave dans les conditions indiquées on procède à l'ensemencement. Pour éviter les nombreux cas de culture négative, j'ai augmenté la quantité de spores et mélangé avec soin par agitation légère les spores avec le milieu de culture.

b) *Soutirage du liquide de culture, et lavage du mycélium.*

Le soutirage a été effectué à l'aide de l'appareil décrit par BACH et représenté fig. 1.

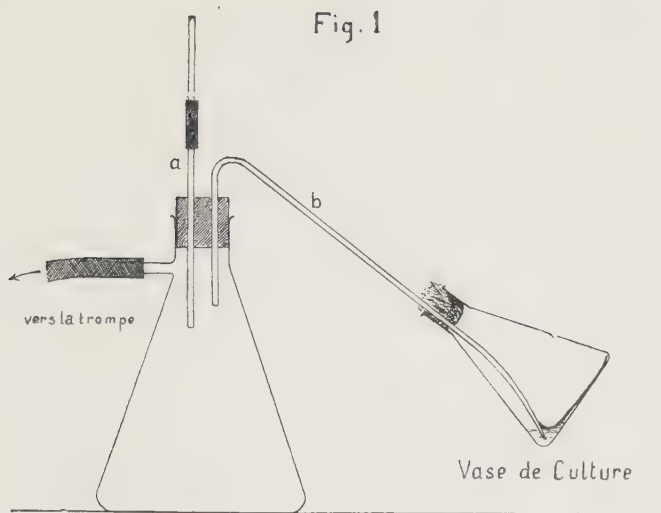


FIGURE 1. — Appareil pour la décantation aseptique des liquides de culture

Il est constitué par une fiole de KITASATO en relation avec la trompe à eau ; elle porte un bouchon percé de deux trous : l'un reçoit un tube de verre (a) que l'on peut obturer par un tube en caoutchouc muni d'une pince ; dans l'autre passe un tube (b) en verre Pyrex courbé à angle aigu, et dont la pointe effilée est légèrement recourbée.

Le tube (a) étant ouvert, on introduit, après l'avoir flambé, le tube (b) au fond de la fiole à expérience maintenue inclinée et dont le goulot a été également passé au feu ; on replace sur la fiole son bouchon de coton et on ferme le tube (a). Le liquide est ainsi retiré par aspiration. Après quelques minutes de repos on recommence l'opération.

On introduit alors sous le mycélium 50 cc. environ d'eau distillée stérile à l'aide de l'appareil suivant (fig. 2).

Un ballon (a), muni à sa partie inférieure d'une tubulure, constitue la réserve d'eau distillée. Sur la tubulure on adapte un tube de caoutchouc de 10 cm. environ, terminé par un tube en Pyrex, étiré à son extrémité et légèrement recourbé (b). Le tube en caoutchouc peut être obturé par une pince. Une clochette en verre (c) protège le col de la fiole.

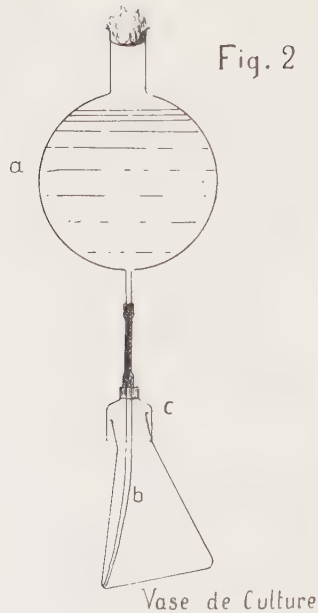


FIGURE 2. — Appareil distributeur d'eau distillée stérile

On fait quatre lavages identiques dans les 24 heures. BACH a montré que dans ces conditions tout le glucose du milieu initial a disparu, et que les autres constituants du milieu ne restent plus qu'à l'état de traces.

c) Mise en place du milieu final.

Après un dernier égouttage, on remplace l'eau de lavage par le milieu sur lequel on veut faire réagir le champignon. L'appareil employé par BACH convient bien lorsqu'on n'utilise qu'un seul milieu ; mais il devenait peu commode pour mes expériences qui comportaient le plus souvent plusieurs milieux différents. Je l'ai remplacé par des pipettes stériles.

Toutes ces opérations longues à décrire, se font en réalité très facilement, et, avec un peu d'habitude, on arrive à ne pas submerger les voiles, ce qui les rendrait inutilisables.

III. — Recherches sur la récolte et le milieu de culture

A) Récolte du mycélium et du milieu après culture.

1) MÉTHODE DE CULTURE DIRECTE.

J'ai suivi en cela la technique de la plupart des expérimentateurs.

Après avoir prélevé 1 cc. du milieu destiné à la détermination du pH, le liquide de culture, retiré par décantation est jeté sur deux filtres sans cendres équilibrés, disposés sur un entonnoir de JOULIE. Le mycélium est lavé par décantation d'abord dans la fiole puis sur le filtre jusqu'à un volume final de 100 cc.

Le mycélium restant sur le filtre est mis à dessécher à l'étuve à 100° pendant 24 heures et pesé à la balance de précision avec les précautions habituelles.

2) MÉTHODE DE CULTURE INDIRECTE.

Comme dans la méthode précédente j'ai recueilli par lavages successifs la totalité du liquide de culture. Mais pour opérer toujours dans des conditions rigoureusement identiques, je me suis astreint à un protocole expérimental bien déterminé.

TECHNIQUE DES LAVAGES :

On prélève tout d'abord 1 cc. de liquide destiné à la mesure du pH. En réalité, comme le milieu a été dilué par 1 cc. environ d'émulsion de spores, et par l'eau contenue dans le mycélium (qui pèse tel qu'on l'utilise environ 2 gr. 50 et seulement 0 gr. 20 environ lorsqu'il est desséché), le centimètre cube prélevé ne représente que 0 cc. 87 de milieu initial, si bien que le liquide restant dans la fiole représente 24 cc. 13 du milieu au lieu de 24 cc. Mais cette erreur, atténuée encore par l'évaporation à l'étuve, est de l'ordre des erreurs d'expériences (0,5 % environ) et je n'en ai pas tenu compte dans mes calculs.

Le liquide restant dans la fiole est décanté sur un entonnoir de JOULIE, muni de deux filtres sans cendres équilibrés, et recueilli dans une fiole jaugée de 200 cc. On le remplace par 25 cc. d'eau distillée, et à l'aide d'un agitateur recourbé à son extrémité on immerge avec soin le mycélium. Au bout de 30 minutes de contact on décante sur le filtre. On recommence 3 fois les lavages espacés de 30 minutes.

A la fin le mycélium est mis à égoutter sur le filtre et pesé après 24 heures à l'étuve à 100°.

La durée totale des lavages est donc de 2 heures.

Les filtrats obtenus, complétés à 200 cc. avec de l'eau distillée, serviront aux dosages.

JUSTIFICATION DE LA MÉTHODE.

Il était bon de s'assurer que dans ces conditions l'acide était complètement récupéré.

Je me suis servi pour cette recherche de voiles d'*Aspergillus niger* et d'un milieu contenant une quantité connue d'acide oxalique.

a) Après 8 heures de contact à l'étuve à 30°, j'ai recueilli séparément le milieu retiré par décantation et les différentes eaux de lavages ; j'ai dosé l'acide oxalique contenu dans chaque fraction.

Ces dosages m'ont permis de construire les courbes de lavages et je donne (fig. 3) les résultats obtenus en partant de milieux de pH différents.

Il apparaît qu'après le quatrième lavage on n'entraîne plus d'acide du mycélium.

Mais la quantité totale d'acide oxalique retrouvé est de 130 mg. en moyenne au lieu de 140 mg. 5 que j'avais introduit.

L'attaque du substrat par le mycélium est-il seul responsable du déficit constaté ? N'y aurait-il pas une certaine quantité d'acide restée adhérente, malgré les lavages, aux hyphes mycéliennes ?

Pour le savoir, les mycéliums épuisés par les lavages ont été triturés avec du sable de FONTAINEBLEAU, de façon à former une pâte. Le sable avait été au préalable purifié par traitement au mélange chromique, lavage, puis traitement à HCl bouillant, nouveau lavage prolongé à l'eau distillée et séchage à l'étuve à 100°.

La pâte obtenue a été traitée par HCl à 1/10 à chaud (2 fois 20 cc.). Dans les liqueurs filtrées sur filtres sans cendres, j'ai pu constater qu'il ne restait plus d'acide oxalique.

b) On pouvait penser qu'une partie du déficit constaté était due à l'assimilation par le mycélium d'une certaine quantité d'acide pendant les deux heures de lavages à la température ordinaire. Mais il n'en est rien, comme le montre l'expérience suivante :

J'ai laissé le mycélium en contact avec le milieu, à la glacière

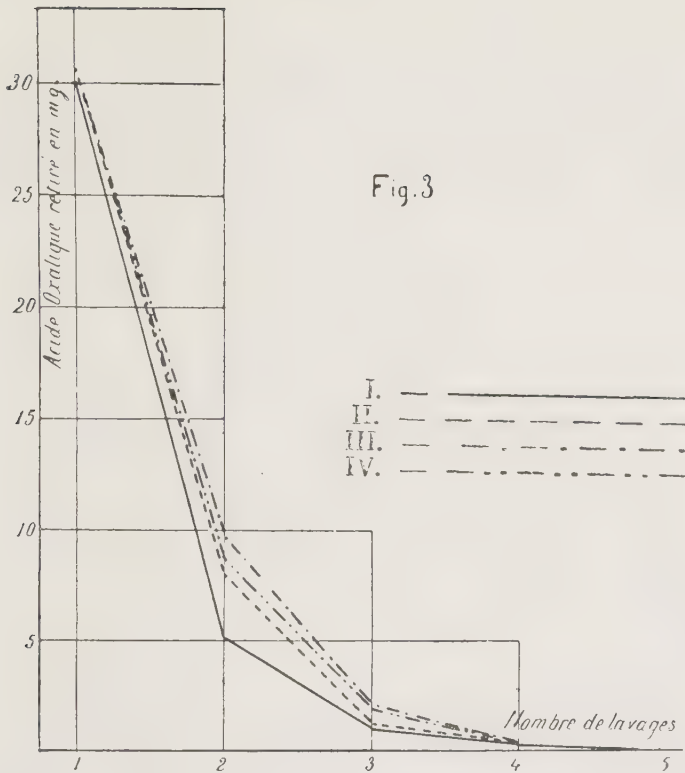


FIGURE 3. — Courbe de lavage de mycélium après 8 heures de contact à l'étuve à 30° avec des milieux à différents pH

I. — pH final 2,04
II. — pH final 2,40

III. — pH final 2,50
IV. — pH final 4,90

à + 1°. A cette température, l'assimilation est considérablement retardée, mais le milieu peut diffuser entre les hyphes. Après les 8 heures de contact, j'ai retiré la fiole de la glacière et effectué les lavages comme précédemment, à la température ordinaire.

Deux expériences semblables m'ont donné les résultats suivants :

Acide oxalique introduit : 140 mg. 5 ;
» » retrouvé : { 140 mg. 1,
140 mg. 8.

B) Dosage du glucose.

Je n'ai pas cherché à suivre systématiquement la consommation du glucose, mais à savoir à quel moment il disparaissait du milieu. Je n'ai donc eu à le doser que dans les expériences en culture directe, car dans la seconde méthode le mycélium, pendant son temps d'action très court, n'était jamais capable d'utiliser tout le glucose.

Je me suis servi de la méthode classique de BERTRAND.

C) Dosage de l'acide oxalique.

J'ai utilisé pour ce dosage la précipitation de l'acide oxalique à l'état d'oxalate de chaux et titrage de l'oxalate par une solution de MnO_4K en milieu sulfurique.

J'ai suivi dans ses grandes lignes la technique indiquée par GUILLAUMIN (1927) pour le dosage de l'oxalémie.

Cette méthode présente l'avantage de ne pas exiger de transvasement, ni de filtration du précipité, opérations qui nuisent toujours beaucoup à la précision du dosage.

TECHNIQUE :

La prise d'essai, contenant 10 à 12 mg. d'acide oxalique pour un volume de 20 cc. environ, est introduite dans un tube à centrifuger cylindro-conique, de 40 cc. de capacité, avec 1 cc. de solution de CaCl_2 à 40 p. 100, et deux gouttes d'une solution de rouge de méthyle à 1 p. 100. On ajuste le pH aux environs de 5 (coloration vieux rose du rouge de méthyle), à l'aide d'ammoniaque et d'une solution au 1/10 d'acide acétique.

Après un repos de 3 heures à la température ordinaire, la précipitation est terminée, comme je m'en suis assuré. On remet le précipité en suspension, en agitant le tube, et on centrifuge 10 minutes à 3.500 tours. Le précipité est alors bien collecté au fond du tube ; on renverse celui-ci d'un geste vif et on le met à égoutter 10 minutes sur plusieurs couches de papier filtre. On sèche ensuite les bords du tube avec une bande de papier filtre, et on remet en suspension le précipité dans 5 cc. d'eau distillée. On recommence comme précédemment centrifugation, décantation et séchage.

Le précipité est alors mis en suspension dans 5 cc. de SO_4H_2 et les tubes sont portés quelques minutes au B. M. bouillant.

On titre l'acide oxalique libéré à l'aide d'une solution N/20 de MnO_4K et d'une microburette.

1 cc. de MnO_4K = 2 mg. 25 d'acide oxalique anhydre.

GUILLAUMIN préconise de faire le dosage en double avec une des prises d'essai double de l'autre, de façon à éviter l'erreur due à la solubilité de l'oxalate dans les solutions de CaCl_2 . Cette erreur, dans mes conditions d'expérience, était très faible et parfaitement négligeable ; elle était, du reste, sans importance, puisque je me plaçais dans les mêmes conditions de dilution pour les milieux, avant et après culture.

Cette méthode m'a donné de très bons résultats et l'erreur entre plusieurs dosages d'une même solution n'excédait jamais 1 pour 100.

Il est bon d'employer des tubes à centrifuger, soigneusement dégraissés au mélange chromique, sinon le précipité a tendance à grimper le long des parois du tube, ce qui entraîne des pertes à la décantation.

D) Dosage de l'acide lactique.

Il était important, pour pouvoir tirer des conclusions valables de mes recherches, de posséder une méthode permettant un dosage précis de l'acide lactique.

Ce dosage a fait l'objet de maints travaux.

Les uns utilisent sa précipitation à l'état de lactate de zinc : mais cette méthode se prête mal à un micro-dosage, à cause de la solubilité trop considérable du lactate de zinc.

Les autres utilisent la propriété que possède MnO_4K d'oxyder à chaud l'acide lactique en acétaldéhyde ; le terme final de l'oxydation est CO_2 , réaction qu'ont appliqué AVERY et HASTINGS (1931) à un dosage gazométrique de l'acide lactique.

L'acétaldéhyde formée est titrée soit colorimétriquement, soit en lui faisant réduire une solution argentique de titre connu (BELLET, 1913), soit, le plus souvent, en l'engageant dans une combinaison bisulfite que l'on titre à l'iode (JÉRUSALEM, 1908 ; FURTH et CHARNASS, 1910 ; CLAUSEN, 1924 ; FRIEDEMANN, COTTONIO et SCHAFER, 1927, etc.).

J'ai utilisé la méthode de FRIEDEMANN, COTTONIO et SCHAFER. J'ai toutefois modifié leur appareil qui possède un réfrigérant insuffisant pour le dosage des quantités relativement importantes d'acide lactique contenues dans mes milieux, et qui ne soustrait pas assez vite l'aldéhyde formée du contact avec MnO_4K .

DESCRIPTION DE L'APPAREIL :

L'appareil représenté figure 4 se compose de trois parties :

- 1) le vase à réaction ;
- 2) le réfrigérant ;
- 3) le vase à fixation de l'acétaldéhyde.

1) — Le vase à réaction est constitué par une fiole d'Erlenmeyer (a) en verre Pyrex à large ouverture, d'une capacité de 300 cc. ; elle est fermée par un bouchon de caoutchouc percé de trois trous. Dans l'un passe un tube à brome de 60 cc. (b), terminé par une pointe effilée qui s'arrête à mi-hauteur de la fiole ; dans un autre passe un tube (c) de petit diamètre dont l'extrémité plonge jusqu'au fond du vase, l'extrémité supérieure étant terminée par un tube de caoutchouc que l'on peut obturer avec une pince ; enfin, le troisième trou reçoit l'extrémité du réfrigérant coudée à 60° environ.

2) — Le réfrigérant (d) est un réfrigérant d'ETAIX, de 30 cm. de long.

3) — L'acétaldéhyde formée est entraînée dans une seconde fiole d'Erlenmeyer, de même forme et de même capacité que la précédente. Elle est fermée par un bouchon de caoutchouc percé de deux trous : dans l'un passe un tube coudé à 30° qui se raccorde au réfrigérant par un bouchon de caoutchouc, dans l'autre passe un tube qui plonge au fond de la fiole et qui s'élargit au sortir de celle-ci en un cylindre de 4 cm. de diamètre (f). Ce cylindre contient des billes de verre sur une hauteur de 3 à 4 cm. ; il est fermé à son extrémité supérieure par un bouchon et porte un peu en dessous une tubulure latérale qui permet de le relier à la trompe à vide.

TECHNIQUE :

La prise d'essai contenant 10 mg. environ d'acide lactique est introduite dans la fiole (a) avec 10 cc. de solution sulfurique de sulfate de manganèse (1) qui sert de catalyseur, et assez d'eau distillée pour amener à un volume final de 80 à 100 cc. On porte à l'ébullition tout

(1) Réactif sulfurique de SO_4Mn : SO_4Mn 100 g
 SO_4H_2 284 cc.
 H_2O qs 1000 cc.

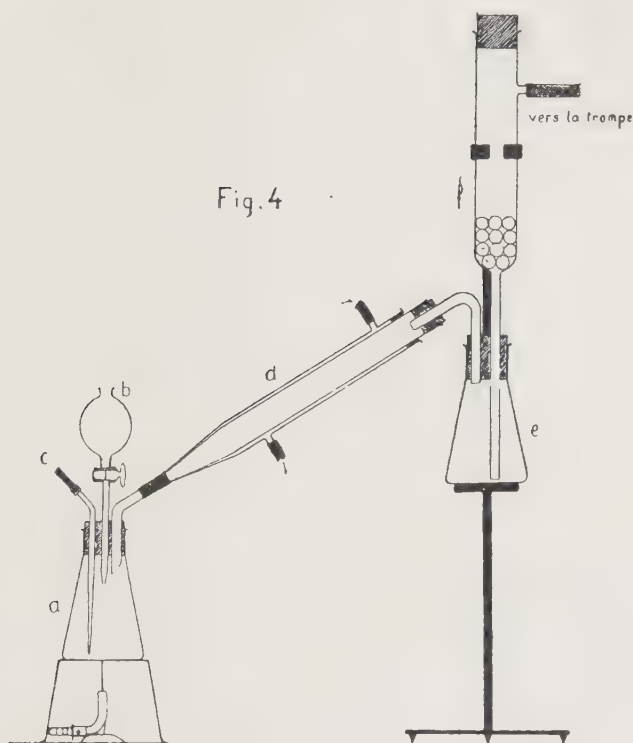


Fig.4

FIGURE 4. — Appareil pour le dosage de l'acide lactique

en faisant une aspiration à la trompe. Au bout de 5 minutes, on enlève l'ensemble de la fiole (e) et du cylindre (f), et on les rince tous deux soigneusement à l'eau distillée.

Cette ébullition préalable a pour but de chasser les corps aldéhydiques et cétoniques préexistants qui fausseraient le dosage. Bien que je n'aie jamais décelé la présence de tels produits dans les liquides de culture, je me suis astreint par prudence à cette opération.

On introduit ensuite dans la fiole (e) 10 cc. d'une solution de bi-sulfite de Na titrée à 1 p. 100 de SO_2 . On rétablit les connexions de l'appareil que l'on relie à la trompe et on porte de nouveau la fiole (a) à l'ébullition. On y introduit, à l'aide du tube à brome (b), goutte à goutte, une solution sulfurique de MnO_4K N/100 (1). L'introduction du réactif doit être assez lente pour que chaque goutte

(1) Solution sulfurique de MnO_4K	N/100	: MnO_4K	N/10	10 cc.
		SO_2	N	10 cc.
		H_2O		80 cc.

ne tombe dans le liquide que lorsque la teinte rose produite par la précédente a complètement disparu. La cadence, rapide au début, se ralentit au fur et à mesure que s'avance la réaction. Celle-ci est terminée lorsque 5 gouttes ajoutées au liquide incolore produisent une teinte rose persistant 20 secondes.

C'est dans l'addition de MnO_4K que réside toute la précision du dosage ; une addition trop rapide produit invariablement des pertes en acétaldéhyde qui peuvent atteindre 20 à 25 p. 100. Ce corps, en effet, est très oxydable et MnO_4K le transforme rapidement en CO_2 .

La réaction terminée, la fiole (e) est enlevée de l'appareil. On rince 7 fois le tube (f) avec 5 cc., chaque fois d'eau distillée.

La fiole (e) contient donc l'acétaldéhyde en combinaison bisulfite, en présence d'un excès de bisulfite.

Le dosage se fait en deux temps :

1) On neutralise d'abord l'excès de bisulfite avec de l'iode $\text{N}/10$, en présence de 10 gouttes d'empois d'amidon comme indicateur ; on s'arrête un peu avant la fin et on termine avec de l'iode $\text{N}/20$ jusqu'à virage bleu franc.

2) Avec 5 g. de CO_3NaH , on libère le bisulfite combiné à l'acétaldéhyde et on le titre avec l'iode $\text{N}/20$ jusqu'à virage bleu franc stable 1/2 minute. Il ne faut pas s'occuper des teintes violacées qui précèdent le virage, elles sont dues, d'après CLAUSEN, à la petite quantité de CO_3Na_2 contenue dans CO_3HNa .

1 cc. d'iode $\text{N}/20$ équivaut à 2 mg. 25 d'acide lactique.

La prise d'essai : 10 cc. de la dilution du milieu initial, correspond à 1 cc. 20 de ce milieu.

Soit n le nombre de cc. d'iode $\text{N}/20$ nécessaires pour oxyder SO_2 combiné à l'acétaldéhyde, la quantité d'acide lactique contenu dans les 25 cc. de milieu de culture sera donnée par l'équation :

$$X = n. 2,25. \frac{25}{1,2} = n. 46,875.$$

Le dosage pratiqué avec les précautions indiquées plus haut donne une erreur par défaut toujours inférieure à 3 p. 100.

DOSAGE DE L'ACIDE LACTIQUE EN PRÉSENCE DE GLUCOSE.

Le glucose est oxydé à chaud par MnO_4K en donnant des produits aldéhydiques, et dans ces conditions le dosage de l'acide lactique devient impossible sans son élimination.

Plusieurs auteurs, CLAUSEN entre autres (loc. cit.), ont signalé, en opérant sur le sang, qu'il ne semblait pas y avoir d'entraînement d'acide lactique au cours de l'élimination du glucose. Comme les

résultats qu'ils obtiennent sont entachés d'une erreur de 10 p. 100 environ, erreur bien supérieure à celle que donne la méthode que j'ai utilisée, il m'a semblé intéressant de voir si les conclusions étaient les mêmes avec mes conditions opératoires. C'est, qu'en effet, FLEURY et P. AMBERT, puis J. COURTOIS ont montré que les hydroxydes métalliques, en milieu alcalin, employés pour l'élimination du glucose étaient capables d'entraîner aussi les polyols même de poids moléculaire peu élevé comme le glycol ; il était donc possible de penser que le phénomène s'applique également à l'acide lactique.

Je me suis servi d'une solution de N/32 d'acide lactique glucosée à 1 g. 25 p. 100, dans laquelle le glucose et l'acide sont dans le même rapport que dans le sang.

Pour l'élimination du glucose, j'ai utilisé la méthode de VAN SLYKE avec SO_4Cu et le lait de chaux, et celle d'AMBERT avec SO_4Cu et la baryte.

1) DÉFÉCATION PAR LA MÉTHODE DE VAN SLYKE.

J'ai suivi par l'addition des réactifs la technique des affusions parallèles successives préconisée par AMBERT et par J. COURTOIS. Elle consiste à ajouter successivement de petites quantités de chaque réactif en agitant chaque fois.

a) *Avec les proportions indiquées par VAN SLYKE.*

Sol. N/32 d'ac. lactique glucosée à 1 g. 25 p. 100	25 cc.
Solution de SO_4Cu à 20 p. 100	10 cc.
Lait de chaux à 10 p. 100	10 cc.

Après 1/2 heure de contact, on complète à 100 cc. ; la centrifugation donne un liquide clair exempt de glucose.

100 cc. de la solution expérimentée contiennent 281 mg. d'acide lactique ; par dosage après défécation on n'en retrouve plus que 246 mg. pour 100 cc. ; il y a donc une perte de 12,1 p. 100.

J'ai soumis au même traitement une solution N/32 d'acide lactique non glucosée, dont le dosage donne un chiffre moyen de 277 mg. d'acide lactique pour 100 cc., donc inférieur de 1,3 p. 100 au chiffre théorique. Après défécation par SO_4Cu et le lait de chaux, cette solution ne contient plus que 249 mg. p. 100 cc. d'acide lactique ; soit une perte de 11,4 p. 100.

On constate donc, compte tenu de l'erreur inhérente au dosage, un entraînement d'acide lactique de l'ordre de 10 p. 100.

b) *Avec les proportions indiquées par FRIEDMAN, COTONIC et SCHAFFER.*

Ces auteurs, dans leur méthode (loc. cit.), emploient des proportions de réactifs différentes de celles de VAN SLYKE :

Sol. N/32 d'ac. lactique glucosée à 1 g. 25 p. 100 et neutralisée par NaOH dilué	5 cc.
Eau distillée	25 cc.
Solution de SO_4Cu à 10 p. 100	4 cc.
Lait de chaux à 10 p. 100	10 cc.

On ne constate plus dans ces conditions qu'une perte de 5,5 p. 100 d'acide lactique.

Alors que l'entraînement semble indépendant dans une large mesure des quantités de réactifs défécants, il diminue un peu avec la dilution de la solution :

Sol. N/32 d'ac. lactique glucosée à 1 g. 25 p. 100	5 cc.	5 cc.	5 cc.	5 cc.
Eau distillée	10 cc.	20 cc.	25 cc.	35 cc.
SO_4Cu à 10 p. 100	4 cc.	4 cc.	4 cc.	4 cc.
Lait de chaux à 10 p. 100	10 cc.	10 cc.	10 cc.	10 cc.
Perte	7,1 p. 100	6 p. 100	5,5 p. 100	5,6 p. 100

2) DÉFÉCATION PAR LA MÉTHODE D'AMBERT.

J'ai opéré comme le recommande l'auteur à 0° dans la glace fondante :

Sol. N/32 d'ac. lactique glucosée à 1 g. 25 p. 100	25 cc.
Solution de SO_4Cu à 10 p. 100	9 cc. 8
Baryte N	60 cc.

Les réactifs défécants sont ajoutés par affusions successives. On complète à 100 cc. après 1/2 heure de contact, et on centrifuge. 50 cc. de ce liquide sont additionnés de 5 cc. de SO_4H_2 au 1/10 et centrifugés à nouveau. Le liquide clair, privé de glucose, sert au dosage de l'acide lactique.

Après défécation, le dosage donne un taux moyen de 228 mg. d'acide lactique p. 100 au lieu des 281 mg. initiaux, soit une perte de 19 p. 100 en acide. Avec une solution N/32 d'acide lactique non glucosée, traitée par les réactifs déféquants, on trouve des chiffres semblables.

Nous venons de voir que dans les deux cas l'acide lactique est entraîné au cours de l'élimination du glucose et plus énergiquement en présence de la baryte que de la chaux.

Il est possible d'éviter l'élimination du glucose, en extrayant par l'éther, comme l'ont fait CLAUSEN (loc. cit.), TANAKA et ENDO (1929), l'acide lactique contenu dans la solution. Mais ces méthodes nécessitent des opérations longues et un matériel encombrant et coûteux qui se prête difficilement à un travail en série.

J'ai tourné la difficulté en utilisant pour mes expériences avec l'acide lactique des milieux sans glucose. Dans ces conditions, la méthode de culture directe devenait inapplicable, car de tels milieux ne permettaient pas le développement du mycélium, et j'ai dû avoir recours à la méthode des voiles solides.

E) Dosage de l'acide acétique.

J'ai utilisé la méthode de DUCLAUX par distillation fractionnée. Elle est basée sur les lois de la distillation formulées par cet auteur :

Si en distillant une solution à 1 ou 2 p. 100 au maximum d'un acide volatil, amenée à un volume constant de 110 cc., on recueille 10 prises successives de 10 cc. exactement mesurés et qu'on les sature par une solution alcaline, les nombres de cc. de la solution alcaline nécessaires pour les saturer sont tels que :

1°) la marche des nombres dans cette série d'opérations est caractéristique de l'acide employé ;

2°) il existe un rapport constant entre la quantité d'acide introduite dans le ballon et la quantité qui a distillé à un moment quelconque, de sorte que l'on peut tirer, de la quantité passée dans les 10, 20, 30, etc., premiers centimètres cubes, la quantité totale de l'acide introduite dans le ballon.

La distillation doit être conduite assez rapidement pour que l'opération ne dure pas plus de 50 minutes en tout.

DUCLAUX ne donne pas de détails pour la construction de l'appareil distillatoire ; mais j'ai pu constater que le fait de faire précéder le tube à dégagement d'un petit réfrigérant à pointes, destiné à arrêter des gouttelettes du liquide en ébullition, faussait sensiblement les résultats.

Je me suis servi d'un appareil distillatoire constitué essentiellement par un ballon en Pyrex de 250 cc., relié par un tube à dégagement, de 20 à 25 cm. de hauteur, à un réfrigérant à boule terminé par un tube effilé (fig. 5).

TECHNIQUE :

La prise d'essai, additionnée de 5 cc. d'acide phosphorique destiné à libérer l'acide acétique, est amenée à un volume de 110 cc.

Il est difficile de recueillir des prises successives de 10 cc. avec exactitude, et pour diminuer les erreurs de lecture j'ai porté leur

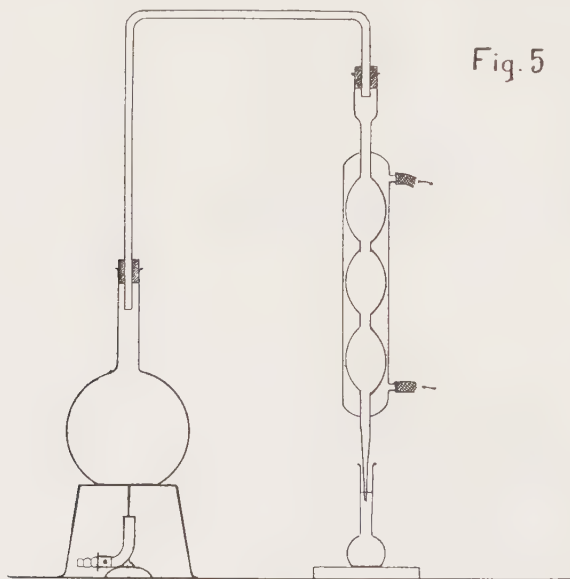


FIGURE 5. — Appareil pour le dosage de l'acide acétique

volume à 20 cc., en recueillant le distillat dans des ballons jaugés de cette capacité ; j'ai borné leur nombre à 3, les deux derniers servant de contrôle au premier.

Les trois prises sont alors saturées par NaOH N/20 en présence de phénol-phtaleine. Il est commode de se servir d'une burette de capacité assez grande et de ne pas la remettre au zéro après chaque opération, on a donc par simple lecture les volumes de NaOH nécessaires pour saturer les 20, 40 et 60 premiers centimètres cubes de distillat.

Les rapports entre le volume de liqueur alcaline nécessaire pour saturer l'acide qui passe dans les diverses fractions et le volume nécessaire pour saturer l'acide de la prise d'essai ont été calculés par DUCLAUX ; ils sont donnés pour l'acide acétique dans la table suivante :

Vol. de distillat :	10 cc.	20 cc.	30 cc.	40 cc.	50 cc.
Rapport :	5,9	12,2	18,7	25,6	32,7
Vol. de distillat :	60 cc.	70 cc.	80 cc.	90 cc.	100 cc.
Rapport :	40,4	48,7	57,5	67,5	80

Si donc on trouve pour les 20, 40 et 60 premiers centimètres cubes de distillat des volumes a, b et c de liqueur alcaline, le volume X nécessaire pour saturer la totalité de l'acide sera donné par les formules :

$$X = \frac{a \times 100}{12,2} = \frac{b \times 100}{25,9} = \frac{c \times 100}{40,4}$$

et comme 1 cc. de NaOH N/20 équivaut à 3 mg. d'acide acétique, il est facile de connaître la quantité totale d'acide contenue dans la prise d'essai.

F) Calcul du degré de dissociation et du reste de dissociation dans les solutions acides complexes.

Les dosages chimiques qui viennent d'être exposés vont nous permettre de connaître la quantité d'acide restant dans le milieu après culture et par différence la quantité consommée pendant le temps de l'expérience. Mais il était nécessaire, pour le but poursuivi, de connaître également l'état de l'acide fourni au champignon. En d'autres termes il fallait pouvoir calculer la quantité d'ions et de molécules entières de l'acide présents dans la solution.

Les travaux de SÖRENSEN et de MICHAELIS ont montré qu'on pouvait connaître dans un milieu complexe contenant un acide en solution, non seulement la concentration des ions H fournis par la dissociation de cet acide, mais aussi la concentration de ses anions et de ses molécules non dissociées.

1) CAS D'UN ACIDE MONOBASIQUE.

On appelle degré de dissociation a , le rapport de l'acide dissocié (S) à la masse totale M de l'acide utilisé :

$$a = \frac{(S)}{M} \quad (1)$$

Le reste de dissociation q est égal au rapport de l'acide non dissocié à la masse totale de l'acide sous toutes ses formes :

$$q = \frac{M - (S)}{M} = I - a \quad (2)$$

mais l'application de la loi d'action de masse nous donne la formule :

$$K = \frac{(H) \times (S)}{(SH)} \quad (3)$$

où K est la constante de dissociation de l'acide (SH) la masse totale de l'acide non dissocié en ions (S) et (H).

La relation (3) peut aussi s'écrire :

$$(SH) = \frac{(H) \times (S)}{K} \quad (4)$$

Comme, d'autre part, la masse totale de l'acide sous ses différentes formes M représente la somme de l'acide non ionisé (SH) et à l'état d'ions (S) :

$$M = (SH) + (S)$$

la relation (1) devient :

$$a = \frac{S}{(SH) + (S)} \quad 5$$

ou, en remplaçant (SH) par sa valeur tirée de (4) .

$$a = \frac{(S)}{\frac{(H)(S)}{K} + (S)} = \frac{1}{1 + \frac{(H)}{(K)}} \quad (6)$$

En connaissant la constante K on peut donc calculer la valeur de a puisque la grandeur (H) est mesurable expérimentalement.

La courbe représentative obtenue dans ces conditions est peu caractéristique, mais elle le devient si l'on emploie la notation logarithmique pH de SÖRENSEN. La formule devient alors :

$$a = \frac{1}{1 + \frac{10^{-pH}}{K}} = \frac{K}{K + 10^{-pH}}$$

La courbe de cette fonction obtenue en portant en abscisses les valeurs de pH et en ordonnées les valeurs correspondantes de a est une courbe en S présentant un point d'inflexion pour :

$$10^{-\text{pH}} = K \text{ ou } \text{pH} = \log. \frac{1}{K}$$

ce qui donne pour cette valeur :

$$a = \frac{1}{2}$$

Cette valeur est caractéristique de l'acide employé et représente le point de demi-saturation. Les courbes obtenues avec différents acides peuvent se déduire les uns des autres par translation parallèle à l'axe des pH.

L'équation de q se déduit de (2) et donne en remplaçant M par sa valeur :

$$q = \frac{(\text{SH})}{(\text{SH}) + (\text{S})} = \frac{1}{1 + \frac{K}{10^{-\text{pH}}}} = \frac{10^{-\text{pH}}}{10^{-\text{pH}} + K} \quad (7)$$

La courbe est symétrique de la précédente par rapport au point d'inflexion.

La concentration de la molécule non ionisée sera donnée par la formule :

$$C_m = c. q$$

Prenons comme exemple le cas de l'acide lactique. La valeur de sa constante de dissociation K est de $1,38 \times 10^{-4}$. Son point de demi-saturation est à

$$\text{pH} = \log. \frac{1}{K} = 3,865$$

et à cette valeur

$$a = q = 0,5$$

Pour des pH de 3, 4, 5 et 6 les valeurs de a et de q obtenues par l'application des formules (6) et (7) sont les suivantes :

pH	3	4	5	6
a	0,121	0,58	0,93	0,993
q	0,879	0,42	0,07	0,007

La concentration en molécules non dissociées par litre d'une solution $N/10$ sera pour ces pH :

pH	3	4	5	6
cm	7,92	0,42	0,067	0,007

2) CAS D'UN ACIDE BIBASIQUE.

Il faut ici considérer deux séries d'ions, l'ion acide et l'ion neutre. L'acide (SH_2) se dissocie en deux phases (SH) et (S). Nous aurons deux degrés de dissociation représentés respectivement par les formules :

$$a_1 = \frac{(\text{SH})}{M} \quad (1)$$

$$\text{et} \quad a_2 = \frac{(\text{S})}{M} \quad (2)$$

le reste de dissociation q sera donné par l'équation :

$$q = \frac{M - [(\text{SH}) + (\text{S})]}{M} \quad (3)$$

Ces acides ont pour chaque phase une constante de dissociation particulière et, en appliquant à ces deux phases la loi d'action de masses, on obtient :

$$K_1 = \frac{(\text{H})(\text{S})}{(\text{SH}_2)} \quad \text{et} \quad (\text{SH}_2) = \frac{(\text{H})(\text{SH})}{K_1} \quad (4)$$

$$\text{et} \quad K_2 = \frac{(\text{H})(\text{S})}{(\text{SH})} \quad \text{et} \quad (\text{SH}) = \frac{(\text{H})(\text{S})}{K_2} \quad (5)$$

comme d'autre part :

$$M = \text{SH}_2 + (\text{SH}) + (\text{S}) \quad (6)$$

on obtient en remplaçant dans (1) et (2) M par sa valeur tirée de (6) :

$$a_1 = \frac{(\text{SH})}{(\text{SH}_2) + (\text{SH}) + (\text{S})} \quad (7)$$

$$\text{et} \quad a_2 = \frac{(\text{S})}{(\text{SH}_2) + (\text{SH}) + (\text{S})} \quad (8)$$

En remplaçant (SH_2) et (SH) par leurs valeurs tirées de (4) et de (5) les équations deviennent :

$$a_1 = \frac{\frac{(\text{H})(\text{S})}{K_2}}{\frac{(\text{H})(\text{H})(\text{S})}{K_1 K_2} + \frac{(\text{H})(\text{S})}{K_2} + (\text{S})} = \frac{1}{1 + \frac{(\text{H})}{K_1} + \frac{K_2}{(\text{H})}} \quad (9)$$

$$a_2 = \frac{S}{\frac{(H)(H)(S)}{K_1 K_2} + \frac{(H)(S)}{K_2} + (S)} = \frac{I}{\frac{(H)^2}{K_1 K_2} + \frac{(H)}{K_2} + I} \quad (10)$$

et enfin

$$q = \frac{I}{1 + \frac{K_1}{H} + \frac{K_1 K_2}{(H)^2}} \quad (11)$$

Les valeurs de K_1 et K_2 étant connues, il est facile de déterminer la courbe représentative de ces fonctions. Dans ce cas également elle est bien plus caractéristique si l'on emploie la notion pH.

Les courbes de q et de a_2 ont une forme analogue à celles obtenues avec les acides monobasiques, et présentent un point d'inflexion respectivement aux points ayant pour abscisses :

$$pH = \log. \frac{I}{K_1} \quad \text{et} \quad pH = \log. \frac{I}{K_2}$$

et pour ordonnées 0,5.

La courbe de a_1 a une forme particulière et présente un maximum à un point dont les coordonnées sont faciles à calculer à l'aide de la dérivée

$$\frac{d(a_1)}{d(H)} = \frac{-K_1(H_2 - K_1 \cdot K_2)}{(H_2 + K_1 \cdot H + K_1 \cdot K_2)^2}$$

qui s'annule pour :

$$H = \sqrt{K_1 K_2} \quad \text{ou} \quad pH = \log. \frac{I}{\sqrt{K_1 K_2}}$$

$$\text{A ce point} \quad a_1 = \frac{I}{2 + \sqrt{\frac{K_2}{K_1}}}$$

$$\text{et} \quad q = a_2 = \frac{I}{2 + \sqrt{\frac{K_1}{K_2}}}$$

Prenons comme exemple l'acide oxalique. Ses constantes de dissociation sont :

$$K_1 = 3,8 \cdot 10^{-2}$$

et $K_2 = 4,9 \cdot 10^{-5}$

Le point d'inflexion des courbes de q et de a_2 sera respectivement à

$$pH = \log. \frac{1}{K_1} = 1,42 \text{ et } pH = \log. \frac{1}{K_2} = 4,31$$

Le maximum de a_1 est à $pH = \log. \frac{1}{\sqrt{K_1 K_2}} = 2,86$

Voici sous forme de tableau, pour les pH 1, 2, 3, 4 et 5, les valeurs de q , a_1 et a_2 et la concentration par litre en molécules non dissociées d'une solution N/10 d'acide oxalique.

pH	q	a_1	a_2	$Cm \text{ p. } 1000$
1	0,725	0,275	0,004	3,26
2	0,207	0,789	0,046	0,93
3	0,024	0,93	0,328	0,11
4	0,002	0,67	0,83	0,01
5	0	0,17	0	0

PARTIE EXPÉRIMENTALE

PREMIÈRE PARTIE

ETUDE DE LA CONSOMMATION DE L'ACIDE OXALIQUE

Il eût fallu, logiquement, commencer l'exposé de ce travail par l'étude d'un acide monobasique ; je commencerai cependant par l'acide oxalique parce que c'est avec lui qu'ont débuté mes expériences et que j'ai précisé les conditions expérimentales. C'est avec cet acide également qu'ont été effectuées les expériences de SAKAMURA qui sont à la base de ce travail.

Les divers auteurs qui l'ont utilisé lui ont, en général, reconnu une valeur alimentaire assez médiocre surtout dans les milieux privés de sucre.

C'est ainsi que CZAPEK, en 1901, a obtenu en présence de sucre de bonnes récoltes avec le sel ammoniacal, mais en absence de sucre des récoltes insignifiantes.

RAVIN, lui aussi, a obtenu de très mauvaises récoltes de *Penicillium glaucum* sur milieu sans sucre, et l'acide oxalique s'est montré de beaucoup le plus toxique de ceux qu'il a utilisés.

Pour KIESEL, l'acide oxalique, acide bien dissocié, a une toxicité sur *Aspergillus niger* de l'ordre de celle de SO_4H_2 .

BUTKEVITSCH (1922) a obtenu avec *Citromyces* de bons développements.

Enfin il n'a fourni à BACH (1925) avec l'*Aspergillus repens* que des cultures peu luxuriantes la plupart du temps, malgré la présence de sucre.

L'acide oxalique est connu depuis longtemps comme un des

produits du métabolisme des champignons inférieurs (WEHMER, 1891).

Après les travaux de RAISTRYK et CLARK (1919), nous devons à MOLLIARD (1919-1924) de très belles recherches sur la formation de cet acide par l'*Aspergillus niger*. Il faut, d'après cet auteur, distinguer l'acide oxalique de neutralisation qui se forme chaque fois que le champignon a à lutter contre des phénomènes d'alcalinisation, et l'acide oxalique de fermentation.

L'*Aspergillus niger*, cultivé sur un milieu contenant tous les éléments minéraux dont il a besoin, respire normalement en oxydant le glucose au maximum, c'est-à-dire jusqu'au stade CO_2 et H_2O . Mais lorsque l'équilibre minéral n'est pas réalisé, sa respiration devient incomplète. Dans un milieu pauvre en azote, l'oxydation s'arrête au stade acide citrique ; l'insuffisance de phosphore amène la production du mélange d'acides citrique et oxalique ; enfin en diminuant le taux de potassium, il se forme uniquement de l'acide oxalique.

BERNHAEUER (1928) continue les travaux de MOLLIARD sur l'*Aspergillus niger*, et il est amené à la découverte de l'oxydase.

Il est possible d'ailleurs que l'oxydation des glucides se fasse au moins en partie par étapes successives. BUTKEWITCH (1922-1924) a constaté sur 10 espèces de champignons que les quantités relatives d'acides citrique et oxalique qui se forment sur des milieux pauvres en azote sont le plus souvent inversement proportionnelles. D'autre part, en fournissant à un champignon de l'acide citrique ce corps disparaît et il se forme de l'acide oxalique.

Ces faits laisseraient supposer que le champignon produit d'abord de l'acide citrique, puis qu'il oxyderait celui-ci pour le transformer en acide oxalique.

Enfin pour KOSTYCHEW et TSCHESNOKOW, cette production d'acides résulterait du fait qu'en l'absence d'azote les produits de dégradation des glucides ne pourraient plus servir à la synthèse protéique et s'accumuleraient dans la cellule puis par exosmose dans le milieu extérieur.

Cet exposé rapide montre l'importance physiologique de l'acide oxalique et partant l'intérêt qui s'attache à l'étude de sa consommation.

L'acide oxalique, de formule $\text{CO}_2\text{H}-\text{CO}_2\text{H}$, est le plus simple des acides bibasiques. Par sa première fonction, c'est un acide fort, presque aussi dissocié que $\text{SO}_4 \text{H}_2$, tandis que c'est un acide faible par presque aussi dissocié que $\text{SO}_4 \text{H}_2$, tandis que c'est un acide faible par

sa deuxième fonction. Au point de vue de sa dissociation, voici quelles sont ses caractéristiques (1) :

TABLEAU I (2)

pH	q	a ₁	a ₂	pH	q	a ₁	a ₂
1,6	39,7	60,13	0,17	4,2	0,1	56,3	43,6
1,8	29,4	70,4	0,2	4,4	0	44,8	55,2
2	20,7	78,9	0,4	4,6	0	33,9	66,1
2,2	14,1	85,2	0,7	4,8	0	24,4	75,6
2,4	9,4	89,5	1,1	5	0	16,9	83,1
2,6	6,1	92,2	1,7	5,2	0	11,4	88,6
2,8	3,9	93,2	2,9	5,4	0	7,5	92,5
3	2,4	93	4,6	5,6	0	4,9	95,1
3,2	1,5	91,4	7,1	5,8	0	3,1	96,9
3,4	0,9	88,3	10,8	6	0	2	98
3,6	0,6	83,2	16,2	6,2	0	1,3	98,7
3,8	0,3	76,2	23,5	6,4	0	0,8	99,2
4	0,2	67	32,8				

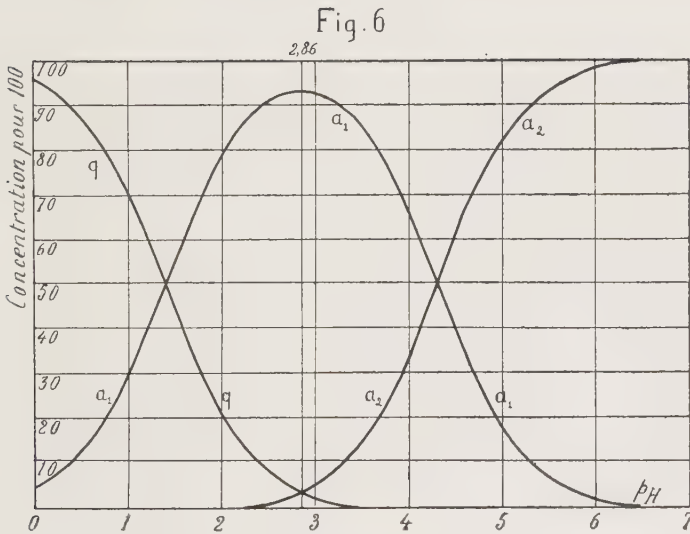


FIGURE 6. — Courbe de dissociation de l'acide oxalique

(1) Ces chiffres ont été pris dans l'ouvrage de SCUDDER (1914).
 (2) Les valeurs de q , a_1 et a_2 ont été conventionnellement rapportées à 100.

$$K_1 = 3,8 \cdot 10^{-2} \quad \text{Log.} \frac{1}{K_1} = 1,42$$

$$K_2 = 4,9 \cdot 10^{-5} \quad \text{Log.} \frac{1}{K_2} = 4,31$$

$$\text{Log.} \frac{1}{K_1 K_2} = 2,86$$

En calculant d'après ces données les valeurs de q , a_1 et a_2 en fonction du pH, on obtient les résultats portés au tableau I. Leur représentation graphique donne les courbes de la figure 6.

CHAPITRE I. — ETUDE DE LA CONSOMMATION
DE L'ACIDE OXALIQUE PAR L'ASPERGILLUS NIGER
VAN TIEGHEM

L'Aspergillus niger est, probablement de tous les champignons inférieurs, celui qui résiste le mieux aux divers agents toxiques, que ce soit les ions H ou d'une façon plus générale les antiseptiques, parmi lesquels il faut compter les acides, comme nous l'avons vu précédemment.

C'était donc un organisme de choix pour ce genre d'étude, puisqu'il peut végéter en présence d'une quantité relativement forte d'acide sur une zone étendue de l'échelle des pH.

1°) EXPÉRIENCES EN CULTURE DIRECTE.

SAKAMURA, dans son travail, employait des volumes de milieu de culture de 100 cc. et 50 cc., quantités qu'il reconnaît trop considérables pour avoir une appréciation exacte du pH après culture. C'est qu'en effet l'équilibre sur un milieu présentant une certaine épaisseur se réalise assez lentement, si bien que la partie supérieure du liquide, qui, en contact direct avec le champignon, lui assure sa nourriture, a une composition et notamment un pH bien différent du reste du milieu.

Pour éviter cette erreur dans la mesure du possible, j'ai réduit à 25 cc. le volume du milieu utilisé. Dans ces conditions, la couche qu'il forme est très mince (moins de 1 centimètre), et l'équilibre peut s'établir rapidement.

EXPÉRIENCE I (tableau II, fig. 7)

Milieu de culture :	Série I	Série II
Oxalate de K N/2	0	6 cc. 25
Constante minérale A (1)	5 cc.	5 cc.
Sol. de N ₃ NH ₄ à 5 p. 100	5 cc.	5 cc.
Glucose	1 g. 125	1 g. 125
Eau distillée	q. s. 25 cc.	25 cc.

(1) Formule de la constante minérale A :

Phosphate monopotassique	2 g. 50
Sulfate de magnésium MgSO ₄ · 7H ₂ O	1 g. 25
Perchlorure de fer à 2 p. 100	1 goutte
Eau distillée	100 cc.

Tableau II

	Série I	Série II
Ac. oxalique initial	0	140 mg.
pH initial	3,66	4,80
Glucose initial	1 g. 125	1 g. 125
Durée de la culture	Variable.	

Série	Durée en jours	pH final	Récolte en mg.	Glucose final en mg.	Ac. oxali. final en mg.	Consommation
I	2	2,25	179	705	0	0
	3	1,97	428	16	0	0
	4	2,06	390	12	0	0
	5	2,22	356	0	0	0
	6	2,37	288	0	0	0
	7	2,39	»	0	0	0
	8	2,49	»	0	0	0
II	2	3,35	192	723	126	14
	3	3,33	420	3	86	54
	4	4,95	346	traces	86	54
	5	6,39	240	0	89	51
	6	6,50	236	0	91,5	48,5
	7	6,65	»	0	90	50
	8	6,65	»	0	89,5	50,5

Les expériences de la série I montrent que dans ces conditions l'*Aspergillus niger* ne produit pas d'acide oxalique.

La consommation de l'acide, rapide au début malgré la présence de glucose, s'arrête au quatrième jour bien qu'à ce moment tout le glucose aie disparu. Comme le pH est passé du troisième au quatrième jour de 3,32 à 4,95, c'est donc entre ces deux valeurs que se place la limite de la consommation de l'acide oxalique.

La représentation graphique donnée figure (7), sous forme de courbes à doubles entrées, met plus nettement en évidence l'allure de cette consommation.

En se reportant à la courbe de dissociation de l'acide oxalique (Fig. 6), on s'aperçoit que le phénomène coïncide assez bien avec la disparition dans le milieu de culture de la phase molécules non dissociées, qui se produit vers pH 3,5—4.

Mais les variations trop rapides du pH, causées par la quantité de milieu trop faible pour l'énergie d'attaque de l'*Aspergillus niger*, rendent difficile la recherche de la limite exacte de la consommation.

L'acidification vient en partie de la dégradation du glucose en acides variés, mais surtout de la source d'azote. En présence de

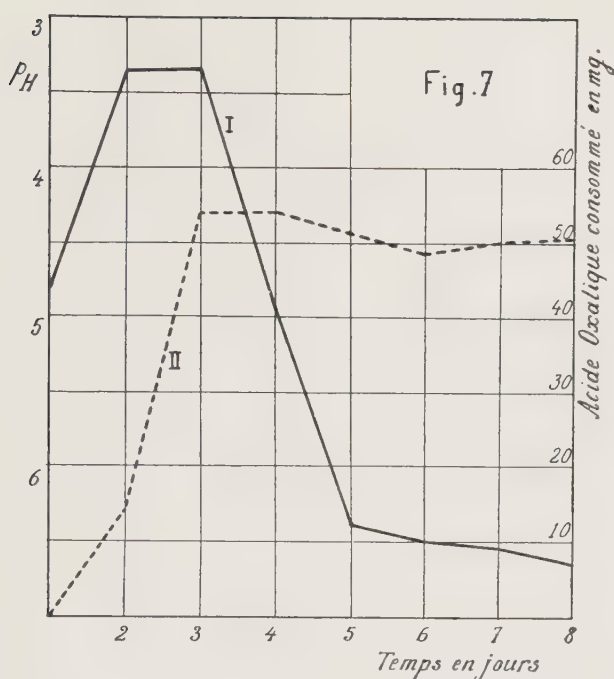


FIGURE 7. — Consommation de l'acide oxalique en fonction du pH

Courbe 1 : Variation du pH en fonction du temps.

Courbe 2 : Consommation de l'acide en fonction du temps.

NO_3NH_4 et pour cette zone du pH, le champignon consomme presque exclusivement l'ion NH_4 , libérant ainsi une quantité importante de radicaux acides NO_3 .

L'emploi de NO_3K seul, rend au contraire obligatoire pour le champignon la consommation de l'azote nitrique qui entraîne une diminution de l'acidité par libération de radicaux basiques.

Pour augmenter encore les chances de voir se préciser la limite cherchée, j'ai employé simultanément des milieux ajustés à des pH différents, étagés sur la zone qui nous intéresse. Les résultats de ces expériences sont rapportés au tableau III, et montrent que dans ces conditions *Aspergillus niger* produit des quantités importantes d'acide oxalique.

Bien qu'on ne puisse tirer aucune conclusion précise de telles expériences, on peut cependant faire quelques remarques. Le

mycélium de la série 1, après 3 jours de culture sur un milieu dont le pH a varié de 2,25 à 2,96, a consommé une quantité déjà appréciable d'acide. Le milieu de la série 2 passant de pH 3,25 à pH 4,14 a conservé la même teneur en acide, fait dû vraisemblablement à une consommation initiale suivie de production. Sur les milieux les moins acides (séries 3 et 4), au contraire, la production de l'acide est apparue dès le début. On retrouve donc encore dans ces expériences une consommation dans les milieux plus acides que pH 3,5 qui n'existe plus aux pH supérieurs.

Il est également intéressant de noter que si d'après les conclusions de SAKAMURA et les résultats obtenus dans ma première expérience, la consommation n'a plus lieu aux pH supérieurs à 4, indiquant une imperméabilité de la membrane cellulaire dans le sens dehors-dedans, l'acide oxalique formé à l'intérieur de l'hyphe mycélienne, en peut cependant sortir à ces pH.

EXPÉRIENCE II (Tableau III)

Milieu de culture :

Sol. d'oxalate de K N/2	250 cc.
NO ₃ K	10 g.
Constante minérale B (1)	50 cc.
HCl N	Variable
Eau distillée q. s.	1000 cc.

Ajusté à quatre pH différents : 2,25, 3,25, 4,48 et 6,45, et réparti à la dose de 25 cc.

(1) Formule de la constante minérale B :

KH ₂ PO ₄	13 g. 60
KCl	7 g. 55
MgSO ₄ · H ₂ O	4 g. 92
ZnSO ₄	0 g. 10
Fe ₂ Cl ₆	1 goutte
Eau bidistillée	q s 500 cc.

TABLEAU III

Ac. oxalique initial en mg. 140
 Glucose initial 1 g. 125
 Durée Variable

Série	pH initial	Durée en jours	pH final	Récolte en mg.	Glucose final en mg.	Ac. oxalique final en mg.	Différence
I	2,25	3	2,96	39	1070	134	— 6
		4	3,59	192	540	146	+ 6
		5	3,62	362	0	175	+ 35
		6	4,04		0	174	+ 34
II	3,25	3	4,14	192	710	140	0
		4	3,71	314	115	201	+ 61
		5	4,05	336	0	187	+ 47
		6	4,39		0	181	+ 41
III	4,48	3	3,86	198	611	210	+ 70
		4	3,31	352	04	313	+ 173
		5	3,96	276	0	272	+ 132
		6	3,99	»	0	268	+ 128
IV	4,48	3	3,85	176	525	207	+ 67
		4	3,11	310	30	358	+ 218
		5	3,49	304	0	335	+ 195
		6	3,77	»	0	327	+ 187

2°) EXPÉRIENCES PAR LA MÉTHODE DES VOILES SOLIDES.

Devant les difficultés soulevées par les expériences précédentes, j'ai poursuivi les recherches en utilisant la méthode des voiles solides décrite plus haut.

Choix du milieu de culture initial.

Le milieu de culture préconisé par BACH pour l'obtention des voiles d'*Aspergillus niger* a la formule suivante :

Constante minérale B sans fer 25 cc.
 Sirop de sucre 50 g.
 Tartrate d'ammoniaque 5 g.
 Eau ordinaire q. s. 1000 cc.

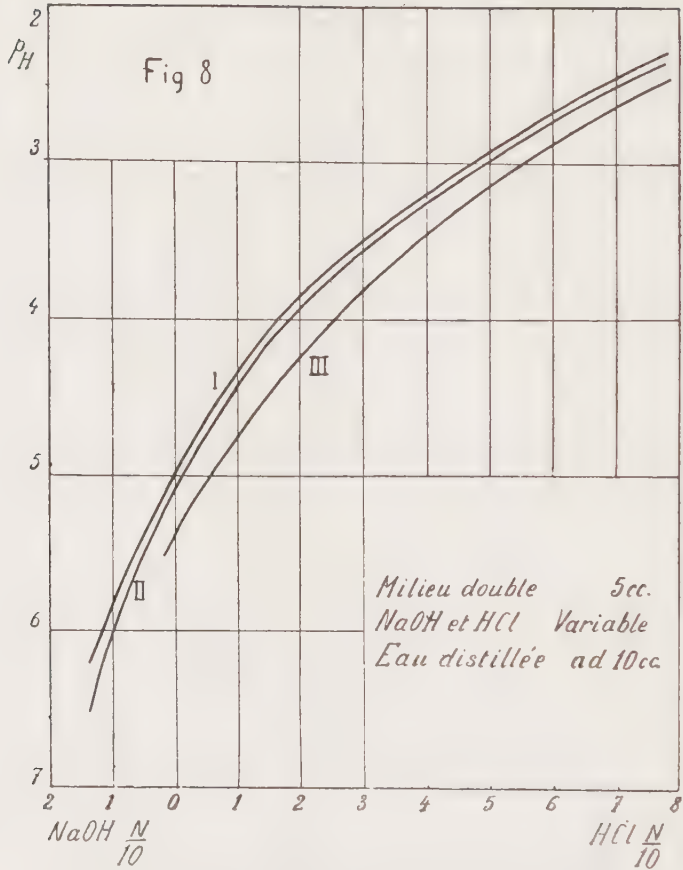


FIGURE 8. — Courbes d'ajustage des milieux de substitution

Courbe I : Milieu complet.

Courbe 2 : Milieu sans glucose.

Courbe 3 : Solution d'oxalate de K N/8.

Il donne des voiles bien formés et bien étalés, mais le champignon sur ce milieu produit des quantités appréciables d'acide oxalique qui peuvent fausser plus tard les résultats.

Après essais, j'ai utilisé des milieux ayant la formule suivante :

Constante minérale A.....	100 cc.
Sol. de NO_3NH_4 à 5 p. 100	100 cc.
Glucose	22 g. 50
Eau distillée	q. s. 1000 cc.

Réparti dans les fioles à culture à la dose de 50 cc. etensemencé avec des spores d'*Aspergillus niger* dans les conditions décrites précédemment, il donne après 5 jours de culture à l'étuve à 30° de beaux voiles non gaufrés qui offrent en outre l'avantage d'être d'un poids très constant.

a) *Consommation de l'acide oxalique par l'Aspergillus niger sur un milieu de substitution complet.*

J'ai laissé pendant 8 heures à l'étuve à 30° les voiles d'*Aspergillus* en contact avec un milieu de substitution de même composition que le milieu de culture de l'expérience I, mais ajusté à quatre pH différents échelonnés de 2 à 5.

EXPÉRIENCE III

Sol. d'oxalate de K N/2 6 cc. 25
Sol. de NO_3NH_4 à 5 p. 100 5 cc.
Constante minérale A 5 cc.
HCl N/2 Variable
Eau distillée q. s. 25 cc.

TABLEAU IV

Acide oxalique initial 140 heures
Durée 8 heures

Série	pH initial	pH final	Récolte en mg.	Ac. oxalique final en mg.	Consommation en mg.
I	2,08	2,07	247	131	9
		2,18	246	132	8
II	2,93	3,06	230	127	13
		2,99	254	131	9
III	3,90	4,05	300	127	13
		3,93	275	129	11
IV	4,87	4,32	310	130	10
		4,18	345	126	14

Contrairement à ce que l'on aurait pu attendre des expériences en culture directe, la consommation de l'acide semble indépendante du pH pour une zone allant de pH 2 à pH 5, puisque dans cette expérience la consommation est à peu près la même dans les quatre séries. (Tableau IV).

Dans les trois premières séries l'acidité n'est pas descendue au-dessus de pH 4 et le mycélium avait encore à sa disposition une certaine quantité d'acide oxalique à l'état moléculaire qui pourrait expliquer la consommation constatée ; et comme dans la série la plus alcaline (série 4) l'acidification est importante, il est possible de penser que, dans ce cas, l'acidité du liquide au contact du mycélium s'est élevé assez pour permettre cette consommation.

La détermination exacte de la différence de pH entre la partie supérieure et le reste du milieu est délicate. Je n'ai pas cherché à la mesurer exactement, mais par une expérience sommaire à en obtenir l'ordre de grandeur.

Dans deux fioles de la série 4 après 8 heures de contact à l'étuve à 30°, les mycéliums sont retirés le plus délicatement possible et mis à égoutter retournés sur le bord d'un entonnoir. Les quelques gouttes ainsi obtenues augmentées de la petite quantité d'eau de lavage de la face inférieure du mycélium avec un petit jet de pissette d'eau bidistillée, sont recueillies dans un tube à essai pour en prendre le pH.

J'ai obtenu les résultats suivants :

	1	2
pH du liquide au contact du mycélium	4,49	4,67
pH du reste du milieu de culture . . .	4,58	4,81

La différence ainsi constatée est appréciable, et elle est en réalité plus grande encore si l'on tient compte de ce que le liquide interstitiel dans lequel baignent les hyphes mycéliennes n'a pu être recueilli par ce procédé, et que d'autre part la dilution a augmenté le pH.

L'hypothèse émise plus haut paraît donc se vérifier ; et il semble qu'en évitant une acidification trop rapide on doive retrouver un phénomène présentant une allure analogue à celle de l'expérience I.

Le remplacement de NO_3NH_4 par NO_3K permettrait d'éviter cette acidification. Mais, de même qu'en culture directe (expérience II), l'*Aspergillus niger* produit en présence de cette source d'azote des quantités importantes d'acide oxalique qui rendent l'interprétation impossible.

Une solution pratique consiste à tamponner le milieu. Trois tampons convenaient pour la zone de pH : le tartrate, le citrate et le phthalate ; mais le tartrate était pour moi inutilisable parce qu'en sa présence l'*Aspergillus* produit de l'acide oxalique.

EXPÉRIENCE IV (Tableau V)

Oxalate de K N/2	6 cc. 25	0
Citrate de Na	0 g. 245	0 g. 245
Sol. de NO_3NH_4 à 5 p. 100 ..	5 cc.	5 cc.
Constante minérale A	5 cc.	5 cc.
HCl N/2	1 cc. 25	0
HCl N/10	0	5 cc. 25
Eau distillée	q. s. 25 cc.	25 cc.
Glucose	1 g. 125	1 g. 125

TABLEAU V

Milieux de substitution citatés et glucosés :

Série	Ac. oxalique initial en mg.	pH initial	Durée en heures	Récolte en mg.	pH final	Ac. oxalique final en mg.	Consommation en mg.
I	140	4,97	8	260	5,15	121	19
			8	251	5,22	122	18
			24	686	3,70	113	27
			24	702	3,95	112	28
II	0	4,79	8	252	4,54	0	0
			24	512	2,16	0	0

EXPÉRIENCE V (Tableau VI)

Oxalate de K N/2	6 cc. 25
Phthalate acide de K N/2	0 g. 510
Sol. de NO_3NH_4 à 5 p. 100	5 cc.
Constante minérale A	5 cc.
Glucose	1 g. 125
Eau distillée	qs 25 cc.

TABLEAU VI

Milieu de substitution phtalaté et glucosé :

pH initial 4,15

Ac. oxalique initial 140 mg.

<i>Durée en heures</i>	<i>Récolte en mg.</i>	<i>pH final</i>	<i>Ac. oxalique final en mg.</i>	<i>Consom- mation en mg.</i>
8	198	4,46	112	28
8	187	4,53	107	33
24	290	3,99	101	38
24	345	3,78	102	39

On trouvera aux tableaux V et VI les résultats obtenus avec le citrate et le phtalate.

Dans les conditions ainsi réalisées les variations de pH sont faibles. Il est à remarquer que dans les deux cas, il se produit une alcalinisation initiale marquée.

BACH l'avait déjà signalé en cultivant l'*Aspergillus repens* sur les sels ammoniacaux d'acide gras. REICHEL, avant lui, avait constaté le même phénomène chez un *Penicillium* et l'attribuait à une réaction de défense de l'organisme contre une substance toxique. Je pense avec BACH qu'une conception aussi étroitement finaliste n'est guère défendable, le citrate entre autres n'étant pas toxique.

Bien qu'au bout de 8 heures le milieu aie subi une alcalinisation importante, on observe une forte consommation d'acide oxalique, qui se poursuit dans les 12 heures suivantes en dépit d'une acidité qui ne s'est guère élevée au-dessus de pH 4.

Il faut donc admettre que dans ces conditions l'acide peut pénétrer sous une autre forme que celle de molécules non dissociées.

b) *Consommation de l'acide oxalique par l'Aspergillus niger sur un milieu de substitution sans glucose.*

L'emploi d'un milieu de substitution privé de glucose va nous permettre, en diminuant l'intensité de l'attaque par le champignon, de suivre avec plus de précision l'allure de la consommation.

Les expériences ont porté sur des milieux de pH échelonnés de 2.75 à 6.25 (Tableau VII).

EXPÉRIENCE VI (Tableau VII, Figure 9)

Sol. d'oxalate de K N/2 6 cc. 25
 Sol. de NO_3NH_4 à 5 p. 100 5 cc.
 Constante minérale A 5 cc.
 HCl et NaOH Variable
 Eau distillée qs 25 cc.

TABLEAU VII

Ac. oxalique initial 140 mg.
 Durée 8 et 24 heures
 pH initial Variable

Série	pH initial	Durée heures en	pH final	Récolte en mg.	Ac. oxalique final en mg.	Consommation en mg.
I	2,75	8	3,24	202	125	15
		8	3,20	192	130	10
		24	3,30	192	110	30
		24	3,10	193	112	28
II	3,34	8	3,67	208	130	10
		8	3,63	200	131	9
		24	3,93	171	121	19
		24	3,82	170	125	15
III	3,95	8	4,69	199	127	13
		8	4,69	205	126,5	13,5
		24	5,47	171	124	16
		24	5,53	174	125	15
IV	5,29	8	5,81	187	136	4
		8	5,76	180	136	4
		24	5,85	161	135	5
		24	5,95	161	134	6
V	6,25	8	6,30	188	138	2
		8	6,33	186	139	1
		24	6,38	164	139	1
		24	6,35	160	139	1

On trouvera figure 9 la représentation graphique des résultats obtenus.

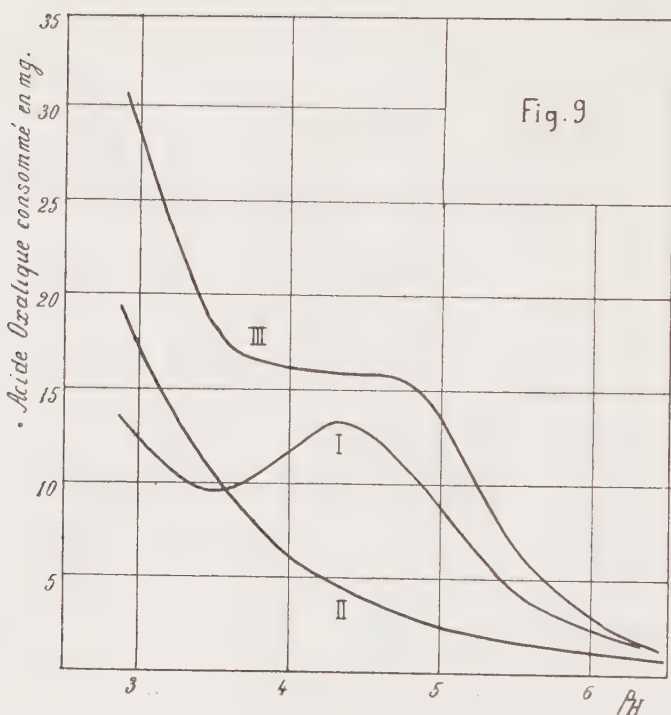


FIGURE 9. — Consommation de l'acide oxalique sur un milieu de substitution sans glucose en fonction du pH

En abscisses les valeurs du pH, en prenant pour cette valeur la moyenne entre le pH initial et le pH moyen après 8 heures et après 24 heures de contact. En ordonnées l'acide consommé en milligrammes (moyenne des 2 expériences).

Courbe 1 : Consommation après 8 heures de contact.

Courbe 2 : Consommation dans les 16 heures suivantes.

Courbe 3 : Consommation après 24 heures de contact.

La consommation de l'acide oxalique s'annule pratiquement vers pH 6,25, c'est-à-dire, en se reportant aux données des courbes de dissociation de cet acide, lorsque la phase ion oxalate acide disparaît de la solution.

Mais alors que les courbes de consommation après 8 heures et 24 heures sont peu caractéristiques, la consommation de la 9^e à la 24^e heure, calculée en prenant la différence entre les moyennes des

consommations après 8 et 24 heures de contact, suit une courbe bien régulière. Cette courbe dans sa partie la plus alcaline suit assez bien la courbe de la phase ion oxalate acide. Mais aux environs de pH 3,5, elle se redresse brusquement au lieu de s'infléchir, comme cela devrait se passer, si l'ion oxalate acide était seul en cause. Ce brusque redressement coïncide avec l'apparition des molécules entières et ne s'explique qu'en admettant une perméabilité plus grande aux molécules non dissociées qu'aux ions oxalate acide.

Les irrégularités de la consommation après 8 heures de contact incitent à penser qu'il y aurait là un phénomène secondaire sur lequel je reviendrai plus tard.

c) *Consommation de l'acide oxalique sur un milieu de substitution composé d'une solution d'oxalate de K seul.*

EXPÉRIENCE VII (Tableau VIII)

Milieu de substitution :

Oxalate de K N/2	6 cc. 25
HCl N/2	Variable
Eau distillée	qs 25 cc.

TABLEAU VIII

Consommation de l'acide oxalique sur un milieu de substitution sans glucose et sans constante minérale.

Acide oxalique initial	140 mg.
Durée	8 heures
pH initial	Variable

Série	pH initial	pH final	Récolte en mg.	Ac. oxalique final en mg.	Consomma- tion en mg.
I	2,12	2,16 2,18	272 253	122,5 121	17,5 19
II	3,07	3,15 3,16	260 258	126 123	14 17
III	3,85	3,96 3,97	272 274	128 129	12 11
IV	5,28	5,59 5,88	269 260	133 134	7 6

En utilisant comme milieu de substitution une solution d'oxalate de K N/8 ajustée à différents pH j'ai obtenu des résultats analogues à ceux de l'expérience précédente. (Tableau VIII).

d) *Influence de la température sur la consommation de l'acide oxalique sur un milieu de substitution complet.*

J'ai recherché l'action du champignon sur un milieu de substitution complet à la glacière (température de $+1^{\circ}$ à $+2^{\circ}$) et à l'étuve

EXPÉRIENCE VIII (Tableau IX)

Milieu de substitution :

Oxalate de K N/2	6 cc. 25
Sol. de NO_3NH_4 à 5 p. 100	5 cc.
Constante minérale A	5 cc.
Glucose	1 g. 125
NaOH N/10	0 cc. 5
Eau distillée	qs 25 cc.

TABLEAU IX

Acide oxalique initial	140 mg.
pH initial	5.20
Durée	Variable
Température	Variable

Tempé- rature	Durée en heures	Récolte en mg.	pH final	Ac. oxalique final en mg.	Consomma- tion en mg.
1°	8	205	»	140	0
	24	202	»	137	3
	36	210	»	128	12
20°	8	219	5.64	129	11
	8	215	5.74	128,5	11,5
	24	447	2.57	110.5	29.5
	24	448	2.69	112,5	27,5
30°	8	360	3.63	126,5	13,5
	8	390	3.48	125,5	14,5
	24	670	2.37	94	46
	24	651	2.42	92,5	47,5
40°	8	264	5.27	115	25
	8	272	5.71	114,5	25,5
	24	636	2.90	112,5	27,5
	24	642	2.68	111	29

aux températures de 20°, 30° qui est la température optima, et 40°. (Tableau IX).

A la glacière le mycélium est à l'état de vie ralentie et les échanges sont très lents. La consommation nulle après 8 heures de contact, insignifiante après 24 heures, devient nettement mesurable après 36 heures.

Comme on devait s'y attendre, c'est à la température de 30° que la consommation est la plus forte après 24 heures. Elle est sensiblement la même aux températures de 20 et 40°.

La consommation dans les 8 premières heures ne suit pas les mêmes lois que celle des 16 heures suivantes.

Elle augmente avec la température, alors que cette dernière présente un maximum à 30°.

Pour les températures de 20° à 40°, le milieu a subi au bout de 8 heures une alcalinisation marquée. Cette alcalinisation initiale déjà rencontrée dans les expériences avec milieux tamponnés au citrate et au phthalate, semble bien due, comme l'a noté BACH, à un déséquilibre dans l'assimilation des divers constituants du milieu : la consommation plus rapide du radical acide que du glucose et de NO_3NH_4 , produit une libération de cations qui alcalinisent le milieu.

e) *Consommation de l'acide oxalique par l'Aspergillus niger en présence de divers oxalates et de glucose.*

Il ne pouvait être question de rechercher l'influence de traces d'éléments, que la méthode des voiles solides ne permet pas : en effet, les lavages du mycélium, si complets qu'ils soient, ne peuvent le priver des dernières traces du milieu nutritif sur lequel il s'est développé.

J'ai voulu simplement rechercher si l'*Aspergillus* se comporte avec divers oxalates comme avec l'oxalate de K.

Le nombre des cations était limité du fait du peu de solubilité des oxalates. Ces expériences ont porté sur les quatre sels suivants : oxalates de K, NH_4 , Na, Li.

Pour pouvoir comparer entre eux les résultats, il était nécessaire de n'apporter au mycélium qu'un seul cation et pour cela de supprimer la constante minérale. Mais afin de respecter la pression osmotique je l'ai remplacée par des quantités équimoléculaires du chlorure correspondant à l'oxalate utilisé.

Cation Potassium :

En supprimant ainsi du milieu complet la constante minérale les résultats sont bien différents de ceux obtenus précédemment. L'*Aspergillus* consomme tout d'abord l'acide oxalique, mais après la huitième heure il en produit des quantités importantes.

EXPÉRIENCE IX (Tableau X)

Oxalate de K N/2	6 cc. 25
KCl	0 g. 186
Glucose	1 g. 125
HCl N/10	1 cc. 37
Eau distillée	qs 25 cc.

TABLEAU X

Cation K :

Ac. oxalique initial	140 mg.
Glucose initial	1 g. 125
pH initial	4.87
Durée	8 et 24 heures

<i>Durée en heures</i>	<i>Récolte en mg</i>	<i>pH final</i>	<i>Ac. oxalique final en mg.</i>	<i>en mg. Différence</i>
8	229	4.71	135,5	— 4,5
8	238	4,80	136,5	— 3,5
24	248	2,80	220,5	+ 80,5
24	248	3,12	174	+ 34

Cation Sodium.

Les résultats obtenus avec le sodium sont identiques aux précédents. Cependant les échanges ont été plus actifs qu'avec le potassium ; le mycélium a augmenté de poids de façon sensible, la consommation initiale de l'acide a été plus forte, de même que la production finale.

EXPÉRIENCE X (Tableau XI)

Oxalate de Na N/2	6 cc. 25
NaCl	0 g. 146
Glucose	1 g. 125
HCl N/10	1 cc. 64
Eau distillée	qs 25 cc.

TABEAU XI

Cation Na :	
Ac. oxalique initial	140 mg.
Glucose initial	1 g. 125
pH initial	4,90
Durée	8 et 24 heures

<i>Durée en heures</i>	<i>Récolte en mg</i>	<i>pH final</i>	<i>Ac. oxalique final en mg.</i>	<i>Différence en mg.</i>
8	315	4,63	128	— 12
8	314	4,61	126	— 14
24	363	2,56	283	+ 143
24	353	2,67	282	+ 142

Cation Ammonium.

Comme il fallait s'y attendre, c'est avec ce cation que la culture est la plus florissante. Le champignon trouvait, en effet, sur un tel milieu la source de carbone et la source d'azote.

La consommation initiale de l'acide est très importante, mais sa production finale moins considérable que dans les expériences précédentes.

EXPÉRIENCE XI (Tableau XII)

Oxalate de NH ₄ N/2	6 cc. 25
NH ₄ Cl	0 g. 134
Glucose	1 g. 125
HCl N/10	0 cc. 87
Eau distillée	qs 25 cc.

TABLEAU XII

Cation NH_4 :

Ac. oxalique initial 140 mg.
 Glucose initial 1 g. 125
 pH initial 4,95
 Durée 8 et 24 heures

<i>Durée en heures</i>	<i>Récolte en mg</i>	<i>pH final</i>	<i>Ac. oxalique final en mg.</i>	<i>Différence en mg.</i>
8	301	4,45	122	— 18
8	298	4,55	122	— 18
24	605	2,11	189	+ 49
24	612	2,01	197	+ 57

Cation Lithium.

EXPÉRIENCE XII (Tableau XIII)

Oxalate de Li N/2 6 cc. 25
 LiCl 0 g. 106
 Glucose 1 g. 125
 HCl N/10 0 cc. 70
 Eau distillée qs 25 cc.

TABLEAU XIII

Cation Li :

Ac. oxalique initial 140 mg.
 Glucose initial 1 g. 125
 pH initial 4,90
 Durée 8 et 24 heures

<i>Durée en heures</i>	<i>Récolte en mg</i>	<i>pH final</i>	<i>Ac. oxalique final en mg.</i>	<i>Différence en mg.</i>
8	166	6,78	138	— 2
8	172	6,68	139	— 1
24	125	6,47	139	— 1
24	140	6,77	138	— 2

Le cas du lithium est spécial. La consommation de l'acide est nulle, et le pH monte rapidement aux environs de 7. Cette alcalinisation est accompagnée d'une perte importante de poids du mycélium. Il y a donc eu protéolyse intense qui s'explique par la toxicité de l'ion lithium.

Cette expérience serait à rapprocher de celles d'ASPREY (1933) qui constate que cet ion provoque une forte exosmose dans les cellules de pomme de terre.

La production d'acide dans les trois premières expériences est due à la combustion incomplète du glucose. Elle est liée, comme l'a montré MOLLIARD dans ses belles recherches sur l'*Aspergillus niger*, au déséquilibre minéral au sein du milieu. J'ai pu, conformément aux conclusions de cet auteur, caractériser la formation d'acide citrique, d'ailleurs peu considérable, dans les trois premières expériences.

Ces expériences montrent une fois de plus le comportement bien différent du mycélium pendant les premières heures de contact avec le milieu de substitution et les heures suivantes.

DISCUSSION.

Nous avons vu au début de cet exposé qu'en culture directe la consommation de l'acide oxalique par l'*Aspergillus niger* se fait uniquement aux dépens de la molécule non dissociée. Les expériences avec la méthode des voiles solides nous ont montré que dans ces conditions le champignon pouvait également assimiler, quoique moins rapidement, les ions oxalate acide.

Il m'a semblé intéressant de rechercher quelle pouvait en être la raison.

Puisque toutes les autres conditions sont identiques, cette divergence ne peut résider que dans la différence entre les mycéliums réagissant sur le milieu.

Ils ont poussé l'un et l'autre à la même température sur des milieux identiques ; mais alors qu'en culture directe il réagit sur le milieu même où il se forme, dans le second cas il subit, avant d'agir, des lavages successifs pendant 24 heures. BACH a montré que dans ces conditions le mycélium continue à respirer aux dépens de sa propre substance, en rejetant comme déchet de l'ammoniaque ; au moment où il entre en contact avec le milieu de substitution il est donc privé d'une grande partie des éléments minéraux que lui ont retiré les lavages à l'eau distillée, et de ses glucides et protides de réserve qu'il a brûlés pour continuer à subsister.

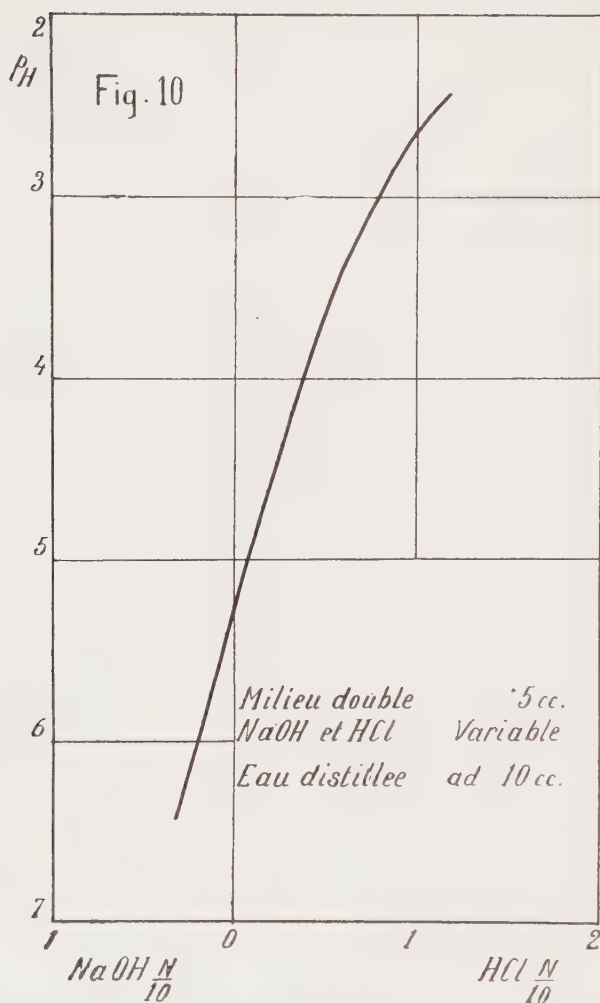


FIGURE 10. — Courbe d'ajustage des solutions de lavages isotoniques

Ces faits, de même que le comportement paradoxal du mycélium au début de son attaque, incitaient à penser que c'était bien dans les lavages du mycélium qu'il fallait rechercher la cause des divergences entre les deux modes d'expérimentation.

Pour remédier à cet état de choses, au lieu de procéder au quatrième lavage à l'eau distillée, qui n'est pas nécessaire, comme l'a montré BACH, puisque les trois premiers lavages suffisent à priver

correctement le mycélium du milieu initial, j'ai mis le voile en contact avec une solution de même composition que le milieu d'étude, mais où l'oxalate a été remplacé par un sel en quantité équivalente pour conserver l'isotonie.

Comme sel je me suis adressé à ClNa dont la pénétration est assez facile (cf. WIERINGA, 1930).

Cette solution est ajustée au même pH que le milieu d'étude, et pour respecter strictement l'isotonie, elle est additionnée d'un volume supplémentaire de ClNa N/2 égal à la différence des volumes de HCl N/2 nécessaire pour ajuster cette solution et le milieu. Elle est soutirée après 16 heures de contact avec le mycélium.

J'ai refait avec des mycéliums ainsi lavés les expériences précédentes.

3°) EXPÉRIENCES PAR LA MÉTHODE DES VOILES SOLIDES, AVEC DES VOILES AYANT SUBI UN DERNIER LAVAGE AVEC UNE SOLUTION ISOTONIQUE AVEC LE MILIEU DE SUBSTITUTION.

a) *Consommation de l'acide oxalique sur un milieu de substitution complet.*

Je me suis assuré que dans ces nouvelles conditions le mycélium ne produisait pas d'acide oxalique (Tableau XIV, Série II).

La consommation est moins énergique qu'avec la méthode initiale. Elle est nette cependant dans la série la plus acide, mais insignifiante dans l'autre, ce qui permet de penser qu'elle n'a pu se produire que lorsque l'acidité s'est élevée au-dessus de pH 4-3,5.

EXPÉRIENCE XIII (Tableau XIV)

Milieu de substitution :	Série I	Série II
Oxalate de K N/2	6 cc. 25	0
Constante minérale A	5 cc.	5 cc.
Sol. de NO ₃ NH ₄ à 5 p. 100 ...	5 cc.	5 cc.
Glucose	1 g. 125	1 g. 125
HCl N/2	Variable	Variable
Eau distillée	25 cc.	25 cc.
	qs	

TABLEAU XIV

	Série I	Série II
Ac. oxalique initial en mg. . .	140	0
Glucose initial	1 g. 125	1 g. 125
pH initial	Variable	Variable
Durée	8 heures	8 heures

Série	pH initial	pH final	Récolte en mg.	Ac. oxalique final en mg.	Consommation en mg.
I	2,84	1,58	498	135	5
		1,45	512	135	5
	5,10	2,78 2,75	371 373	139 138,5	1 1,5
II	3,68	2,46	365	0	0
		2,45	386	0	0

Un milieu tamponné au phtalate va nous permettre, en stabilisant le pH, de conclure plus aisément.

Après 8 heures de contact le pH est resté supérieur à 4 et la consommation de l'acide est nulle. *L'Aspergillus niger* ne peut donc plus consommer les ions oxalates acides comme il le faisait précédemment. Mais la consommation se produit lorsque le pH est inférieur à cette valeur, c'est-à-dire lorsque les molécules non dissociées apparaissent dans le milieu.

On ne constate plus cette fois d'alcalinisation initiale comme dans l'expérience analogue avec la technique primitive. Ce fait semble bien être dû à ce que, le mycélium se trouvant dans des conditions plus normales, le déséquilibre entre l'alimentation carbonée et azotée a disparu.

EXPÉRIENCE XIV (Tableau XV)

Milieu de substitution :

Oxalate de K N/2	6 cc. 25
Phtalate acide de K	0 g. 510
Constante minérale A	5 cc.
Sol. de NO_3H_4 à 5 p. 100	5 cc.
Glucose	1 g. 125
Eau distillée	qs 25 cc.

TABLEAU XV

Ac. oxalique initial	140 mg.
Glucose initial	1 g. 125
pH initial	4,20
Durée	8 et 24 heures

<i>Durée en heures</i>	<i>pH final</i>	<i>Récolte en mg.</i>	<i>Ac. oxalique final en mg.</i>	<i>Consomma- tion en mg.</i>
8	4,10	208	140	0
8	4,12	212	140	0
24	3,71	268	138	2
24	3,68	272	137,5	2,5

b) *Consommation de l'acide oxalique sur un milieu de substitution sans glucose.*

Pour établir la courbe de la consommation, seul un milieu sans glucose était susceptible de nous donner des indications assez précises (Tableau XVI). On trouvera, figure 11, la représentation graphique des résultats obtenus dans ces conditions.

EXPÉRIENCE XV (Tableau XVI, Figure 11)

Milieu de substitution :

Oxalate de K N/2	6 cc. 25
Constante minérale A	5 cc.
Sol. de NO_3H_4 à 5 p. 100	5 cc.
HCl N/2	Variable
Eau distillée	qs 25 cc.

TABLEAU XVII

Milieu de substitution sans glucose.

Voiles lavés avec solution isotonique.

Ac. oxalique initial 140 mg.

pH initial Variable

Durée 8 et 24 heures

<i>Série</i>	<i>pH initial</i>	<i>Durée en heures</i>	<i>pH final</i>	<i>Récolte en mg.</i>	<i>Ac. oxalique final en mg.</i>	<i>Consommation en mg.</i>
I	2,65	8	2,62	196	135	5
		8	2,62	194	134,5	5,5
		24	2,69	188	132	8
		24	2,70	197	129	11
II	3,07	8	3,11	200	136,5	3,5
		8	3,12	204	136	4
		24	3,20	185	134,5	5,5
		24	3,22	185	133,5	6,5
III	3,29	8	3,32	190	138	2
		8	3,34	190	138	2
		24	3,38	192	137,5	2,5
		24	3,38	186	136,5	3,5
IV	3,60	8	3,71	195	139	1
		8	3,65	190	139	1
		24	3,72	180	138	2
		24	3,68	185	138,5	1,5
V	3,86	8	3,91	195	139	1
		8	3,93	194	138,5	1,5
		24	4,03	188	138,5	1,5
		24	4,06	175	138	2

On voit par ces courbes que la consommation est assez étroitement proportionnelle à la quantité de molécules entières présente dans le milieu.

Cette consommation ne s'arrête pas brusquement, mais diminue graduellement pour s'annuler vers pH 4. Ce fait s'explique très aisément : il reste en effet dans le milieu jusqu'à ce pH une certaine quantité de molécules entières, faible il est vrai, mais qui se reforme aussitôt absorbée par suite de la loi d'action de masses.

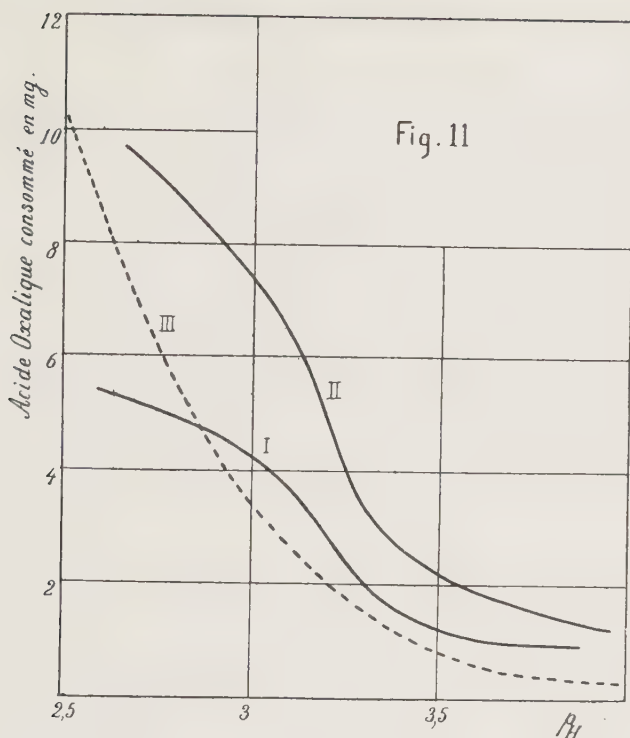


FIGURE II. — Consommation de l'acide oxalique par des voiles d'*Aspergillus niger* ayant subi un dernier lavage avec une solution isotonique au milieu de substitution

I : Consommation après 8 heures de contact.

II : Consommation après 24 heures de contact.

III : Courbe des quantités d'acide non dissocié présentes dans le milieu.

CONCLUSIONS POUR L'ACIDE OXALIQUE ET L'*ASPERGILLUS NIGER*.

I. — *Expériences en culture directe.*

De même que dans les expériences de SAKAMURA la consommation se fait uniquement aux dépens des molécules non dissociées, même lorsque tout le glucose a disparu.

II. — *Expériences par la méthode des voiles solides.*

a) Voiles lavés quatre fois à l'eau distillée.

Dans ces conditions, l'*Aspergillus niger* consomme les molécules non dissociées, et également, quoique moins rapidement, les ions oxalate acide.

Le comportement du mycélium est différent dans les premières heures de contact et dans les heures suivantes.

b) Voiles lavés trois fois à l'eau distillée et la dernière fois avec une solution isotonique avec le milieu de substitution.

Cette fois le comportement du mycélium est régulier dès les premières heures de contact. La consommation est plus étroitement proportionnelle au temps.

Comme en culture directe le champignon ne consomme que les molécules non dissociées.

CHAPITRE II. — ETUDE DE LA CONSOMMATION DE L'ACIDE OXALIQUE PAR L'ASPERGILLUS REPENS DE BARY

L'*Aspergillus repens* donne un mycélium moins vigoureux que le précédent. S'il supporte relativement bien une concentration élevée en ions H, puisque BACH a pu le faire développer sur des milieux de pH 1,8, il résiste beaucoup plus difficilement à l'action toxique des acides.

Il présentait cependant pour ces expériences l'avantage de produire beaucoup moins facilement de l'acide oxalique.

1°) EXPÉRIENCES EN CULTURE DIRECTE.

BACH (loc. cit.), en cultivant l'*Aspergillus repens* sur des milieux contenant de l'acide oxalique, a constaté que la culture était négative aux pH inférieurs à 4. C'est également vers cette valeur que se place la limite de culture dans mes expériences.

Il fallait donc éviter une acidification trop rapide et c'est pourquoi j'ai remplacé NO_3NH_4 comme source d'azote par NO_3K , qui, ici, ne présentait pas l'inconvénient de provoquer la formation d'acide oxalique.

EXPÉRIENCE XVI (Tableau XVII)

Milieu de culture :

Oxalate de K N/2	250 cc.
NO_3K	10 g.
Glucose	50 g
Constante minérale B	50 cc
HCl et NaOH	Variable
Eau distillée	qs 1000 cc.

Le milieu a été ajusté à quatre pH différents : 2,5, 3,5, 4,7 et 6,2 ; et réparti dans des fioles d'Erlenmeyer à la dose de 25 cc.

TABLEAU XVII

Ac. oxalique initial	140 mg.
Glucose initial	1 g. 125
pH initial	Variable
Durée	20 jours

<i>pH</i> <i>initial</i>	<i>pH</i> <i>final</i>	<i>Récolte</i> <i>en mg.</i>	<i>Glucose</i> <i>final</i> <i>en mg.</i>	<i>Ac. oxalique</i> <i>final</i> <i>en mg.</i>	<i>Consom-</i> <i>mation</i> <i>en mg.</i>
2,5	2,5	0	1125	140	0
3,5	3,5	0	1125	140	0
4,7	6,86	129	0	123,5	16,5
6,2	5,9	137	+	128,5	11,5

Il est impossible de préjuger de la valeur alimentaire de la molécule entière puisque la toxicité est telle que le champignon ne pousse plus dans les milieux où elle existe.

Le fait que la consommation est plus considérable dans la série 3 que dans la série 4 semble indiquer un rôle important de l'ion oxalate acide. Mais par suite de la toxicité du milieu de culture les résultats manquent de netteté.

2°) EXPÉRIENCES PAR LA MÉTHODE DES VOILES SOLIDES.

La culture indirecte va nous permettre d'obvier, au moins en partie, à l'influence toxique de l'acide oxalique. Les mycéliums adultes sont en effet plus résistants et peuvent encore assimiler sur des milieux qui ne permettent plus la germination des spores.

Milieu de culture initial :

Le milieu suivant m'a donné de bons résultats :

Décoction de carottes à 500 g. p. 2000 cc. . .	1000 cc.
Constante minérale B	50 cc.
Glucose	50 g.
Citrate de Na	20 g.
ClNa	20 g.
HCl	10 cc.

Le citrate sert de tampon ; l'addition de NaCl a pour but d'augmenter la pression osmotique du milieu, l'*Aspergillus repens* ayant besoin d'une pression osmotique élevée pour se développer.

L'addition de HCl a pour but d'amener le pH aux environs de 6, pH optimum pour la germination des spores (KLEBS, MANGIN, BACH).

Ce milieu est réparti à la dose de 50 cc. dans les fioles d'Erlenmeyer, et stérilisé dans les conditions habituelles.

Ensemencé avec 20 gouttes de l'émulsion de spores, il m'a donné des cultures bien régulières, présentant après 7 jours à l'étuve à 27° (température optima) un début de sporulation. Ce sont des voiles de cet âge que j'ai utilisés.

a) *Consommation de l'acide oxalique sur un milieu de substitution complet.*

Les résultats obtenus en présence de glucose manquent de netteté, et ces expériences n'ont été effectuées qu'à titre d'orientation. On les trouvera rapportés au tableau XVIII.

On remarquera dans ces expériences la convergence des pH après 24 heures de contact (Fig. 12). Ce phénomène peut s'expliquer de la façon suivante :

Le mycélium agit sur le milieu de deux façons différentes qui font subir au pH des variations de signes contraires. D'une part, le champignon assimile le radical acide et libère ainsi la base qui lui était associée, d'où il résulte une alcalinisation du milieu. D'autre part, BACH a montré que l'*Aspergillus repens*, à l'encontre de l'*Aspergillus niger*, peut se comporter avec NO_3NH_4 comme source d'azote de deux façons différentes : dans les milieux acides (pH 3-4) il assimile de préférence l'ion nitrique en libérant de l'ammoniaque ; dans les milieux peu acides, au contraire, il consomme surtout l'ion ammoniacal et les radicaux nitriques mis en liberté acidifient le milieu.

On conçoit donc aisément que suivant le pH initial les variations soient différentes. Les milieux les plus acides s'alcalinisent à la fois par suite de l'assimilation de l'acide oxalique et de l'ion nitrique, les milieux peu acides au contraire s'acidifient par suite de la disparition des ions ammoniacaux que ne compense pas la consommation de l'acide oxalique devenue très faible.

On voit par ces expériences (tableau XVIII) que l'*Aspergillus repens* assimile beaucoup plus rapidement l'acide oxalique que l'*Aspergillus niger*. La consommation très forte vers pH 5 diminue

EXPÉRIENCE XVII (Tableau XVIII, Figure 12)

Milieu de substitution :

Oxalate de K N/2	6 cc. 25
Sol. de NO_3NH_4 à 5 p. 100	5 cc.
Constante minérale A	5 cc.
Glucose	1 g. 125
HCl N/2	Variable
Eau distillée	qs 25 cc.

TABLEAU XVIII

Ac. oxalique initial	140 mg.
Glucose initial	1 g. 125
pH initial	Variable
Durée	8 et 24 heures

Série	pH initial	Durée en heures	pH final	Récolte en mg.	Ac. oxalique final en mg.	Consommation en mg.
I	4,01	8	5,02	150	102	38
		8	5,05	153	104	36
		24	5,45	170	69	71
		24	5,45	176	70	70
II	5,96	8	5,44	145	123	17
		8	5,42	150	122	18
		24	5,45	180	93	47
		24	5,41	190	95	45
III	6,28	8	5,97	142	133	7
		8	5,96	145	134	6
		24	5,94	163	117	23
		24	5,92	168	118	22

Fig 12

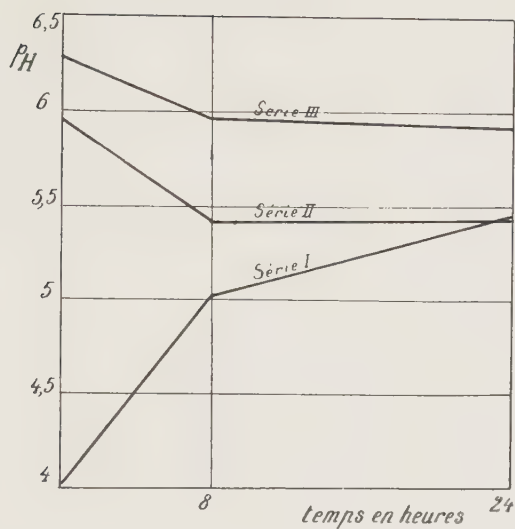


FIGURE 12. — Convergence des pH par action des voiles d'*Aspergillus repens* sur un milieu de substitution complet

rapidement comme la concentration en ions H, suivant en cela la courbe des quantités d'ions oxalate acide présentes dans la solution. On ne peut tirer aucune conclusion quant à la pénétration des molécules entières puisque dans la série la plus acide (pH initial 4,01) les molécules non dissociées n'existent déjà plus, et qu'à aucun moment le milieu ne devient plus acide.

b) *Consommation de l'acide oxalique sur un milieu de substitution sans glucose.*

La convergence des pH notée plus haut est très gênante pour établir les courbes de consommation en fonction du pH, puisqu'elle tend dans tous les cas à ramener le mycélium dans les mêmes conditions. La suppression du glucose va nous permettre, en diminuant la puissance d'attaque du champignon, d'éviter cet inconvénient.

Une expérience préliminaire m'a permis de constater que le comportement des voiles d'*Aspergillus repens* était le même qu'ils aient été lavés seulement à l'eau distillée, ou qu'ils aient subi, comme dans le cas de l'*Aspergillus niger*, un dernier lavage avec une solution

isotonique avec le milieu de substitution. J'ai préféré me servir de ces derniers pour éviter les irrégularités toujours possibles avec les voiles épuisés.

Les voiles utilisés dans les expériences qui vont suivre ont donc été lavés trois fois à l'eau distillée pour les priver du milieu initial, le quatrième lavage, d'une durée de 16 heures, a été effectué avec une solution isotonique avec le milieu de substitution préparée dans les conditions décrites au chapitre précédent.

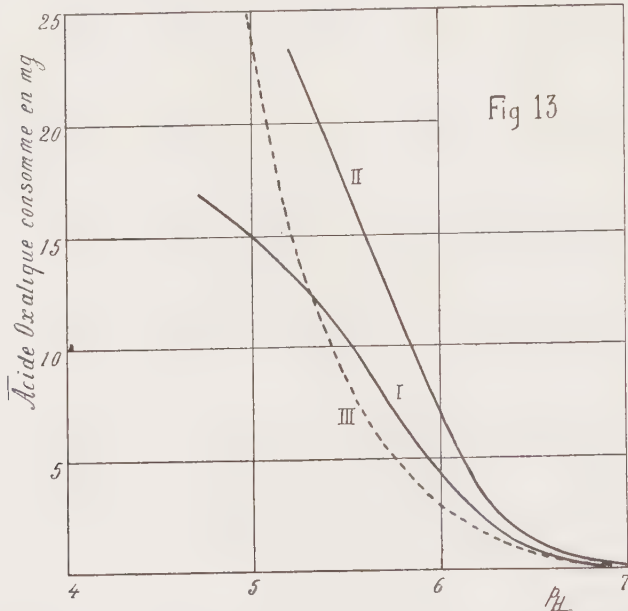


FIGURE 13. — Consommation de l'acide oxalique en fonction du pH par l'*Aspergillus repens* sur un milieu de substitution sans glucose

I : Consommation après 8 heures de contact.

II : Consommation après 24 heures de contact.

III : Courbe des quantités d'ions oxalate acide présentes dans le milieu.

EXPÉRIENCE XVIII (Tableau XIX, Figure 13)

Milieu de substitution :

Oxalate de K N/2	6 cc. 25
Constante minérale A	5 cc.
Sol. de NO_3NH_4 à 5 p. 100	5 cc.
HCl et NaOH	Variable
Eau distillée	qs 25 cc.

TABLEAU XIX

Voiles lavés avec une solution isotonique ; milieu sans glucose.

Ac. oxalique initial 140 mg.
pH initial Variable
Durée 8 et 24 heures

<i>Série</i>	<i>pH initial</i>	<i>Durée en heures</i>	<i>pH final</i>	<i>Récolte en mg.</i>	<i>Ac. oxalique final en mg.</i>	<i>Consommation en mg.</i>
I	2,62	8	2,65	142	140	0
		8	2,64	148	139,5	0,5
		24	2,68	148	139,5	0,5
		24	2,65	146	140	0
II	3,17	8	3,20	147	140	0
		8	3,20	140	140	0
		24	3,20	137	140	0
		24	3,20	142	140	0
III	4,34	8	5,36	140	123,5	16,5
		8	5,34	138	124,5	15,5
		24	6,16	143	118	22
		24	6,15	142	116,5	23,5
IV	5,26	8	6	135	131	9
		8	5,96	138	131,5	8,5
		24	6,28	138	128,5	11,5
		24	6,28	140	128,5	11,5
V	6,25	8	6,28	140	138	2
		8	6,28	142	138	2
		24	6,38	136	137,5	2,5
		24	6,35	141	137,5	2,5
VI	6,99	8	7,01	138	140	0
		8	7,01	142	140	0
		24	7,03	140	140	0
		24	7,02	136	140	0

La consommation dans les séries les plus acides, (pH 2,62 et 3,17) est nulle, et ce fait ne peut être dû qu'à la toxicité très grande du milieu à ces pH.

Dans les séries suivantes, elle diminue progressivement avec la concentration en ions H pour s'annuler aux environs de pH 6,30.

Les courbes de consommation que j'ai reproduites figure 13 montrent clairement la dépendance étroite entre l'absorption de l'acide et la présence des ions oxalate acide dans le milieu.

Comme la toxicité de l'acide oxalique est assez grande aux pH voisins de 3 pour se faire sentir encore lorsque sa concentration dans le milieu a été réduite de moitié (tableau XX), il est impossible de savoir si l'acide non dissocié est absorbé. Mais comme cette action n'est pas due aux ions H puisque le champignon peut se développer à ces pH, en l'absence d'acide oxalique, on doit logiquement penser que ce sont précisément ses molécules entières qui conditionnent la toxicité par leur absorption trop rapide.

Il est intéressant de noter (tableau XIX, série VI et tableau XXII) que le mycélium ne consomme jamais les ions oxalates neutres, que les voiles aient été lavés avec une solution isotonique ou seulement à l'eau distillée.

EXPÉRIENCE XIX (Tableau XX)

Milieu de de substitution :

Oxalate de K N/4	6 cc. 25
Constante minérale A	5 cc.
Sol. de NO_3NH_4 à 5 p. 100	5 cc.
HCl N/2	0 cc. 70
Eau distillée	qs 25 cc.

TABLEAU XX

Voiles lavés avec une solution isotonique.

Milieu de substitution sans glucose :

Ac. oxalique initial	70 mg.
pH initial	2.93
Durée de contact	8 et 24 heures

<i>Durée en heures</i>	<i>pH final</i>	<i>Récolte en mg.</i>	<i>Ac. oxalique final en mg.</i>	<i>Consommation en mg.</i>
8	2.96	156	70	0
8	2.95	150	70	0
24	2.96	151	70	0
24	2.96	152	70	0

EXPÉRIENCE XX (Tableau XXI)

Milieu de substitution :

Oxalate de K N/2	6 cc. 25
Constante minérale A	5 cc.
Sol. de NO ₃ NH ₄ à 5 p. 100	5 cc.
NaOH N/2	0 cc. 38
Eau distillée	qs 25 cc.

TABLEAU XXI

Voiles lavés seulement à l'eau distillée.

Milieu de substitution sans glucose.

Ac. oxalique initial	140 mg.
Durée de contact	8 et 24 heures
pH initial	6,99

<i>Durée en heures</i>	<i>pH final</i>	<i>Récolte en mg.</i>	<i>Ac. oxalique final en mg.</i>	<i>Consommation en mg.</i>
8	7	141	140	0
8	7,01	142	140	0
24	7,02	138	140	0
24	7,02	137	140	0

CONCLUSIONS DE CE CHAPITRE.

Les expériences en culture directe ne permettent pas de tirer des conclusions précises. On peut cependant constater l'absorption des ions oxalate acide.

En culture indirecte, que les voiles aient été ou non lavés avec une solution isotonique au milieu de substitution, l'*Aspergillus repens* absorbe les ions oxalate acide, mais jamais les ions oxalate neutre.

L'absorption des molécules non dissociées doit être très rapide, mais il est impossible de la mettre en évidence, car le milieu devient toxique en leur présence.

En résumé l'*Aspergillus repens* semble donc se comporter comme les voiles épuisés d'*Aspergillus niger*. Toutefois la consommation est plus rapide qu'avec ces derniers.

CHAPITRE III. — CONSOMMATION DE L'ACIDE OXALIQUE PAR LE *PENICILLIUM GLAUCUM* LINK

Ce champignon est encore moins résistant que le précédent. Il exige pour se développer des conditions plus strictes, en dehors desquelles il ne donne que des îlots immergés d'aspect glaireux qui ne se réunissent pas en voile compact. Nous avons vu en outre avec les expériences de RAVIN que l'acide oxalique était très toxique pour lui.

1°) EXPÉRIENCES EN CULTURE DIRECTE.

Des milieux contenant NO_3NH_4 et NO_3K comme source d'azote, ne m'ont donné que des cultures peu florissantes, avec lesquelles la toxicité de l'acide et des ions H rendaient impossible toute expérimentation.

Le glycocolle, au contraire, s'est montré une source d'azote excellente, avec laquelle j'ai obtenu de belles cultures où le voile bien formé était sporulé dès le troisième jour dans les milieux les moins acides et le quatrième dans les autres.

Au bout de 6 jours de culture, le mycélium secrète abondamment un pigment dont la couleur varie du jaune au brun suivant le pH du milieu. Ces pigments m'ont gêné pour le dosage de l'acide oxalique dans les vieilles cultures.

EXPÉRIENCE XXI (Tableau XXII, Figures 14, 15, 16, 17, 18)

Milieu de culture :

Oxalate de K N/2	250 cc.
Glycocolle	7 g. 50
Constante minérale B	50 cc.
Glucose	50 g.
HCl	Variable
Eau distillée	qs 1000 cc.

Milieu ajusté à 4 pH différents : 3,27, 3,71, 4,70 et 5,68.

Réparti à la dose de 25 cc.

TABLEAU XXII

Ac. oxalique initial 140 mg.
 Glucose initial 1 g. 125
 pH initial Variable
 Durée Variable

Série	pH initial	Dur. en jou.	pH final	Récolte en mg.	Glucose final en mg.	Ac. oxalique final en mg.	Consommation en mg.
I	3,27	3	2,89	32	1011	137	3
		4	2,68	289	815	133	7
		5	6,06	352	250	95	45
		6	5,85	451	++	88	52
		7	7,21	449	0	95,5	44,5
		8	7,20	422	0	?	?
II	3,71	3	3,42	32	975	137	3
		4	4	189	706	124	16
		5	6,12	433	++	109	31
		6	6,93	490	+	109	31
		7	7,64	431	0	114	26
		8	7,66	393	0	?	?
III	4,70	3	4,72	117	853	138	2
		4	5,36	358	420	132,5	7,5
		5	7,16	485	Traces	131	9
		6	7,53	442	0	134	6
		7	7,86	402	0	137	3
		8	8,28	386	0	?	?
IV	5,68	3	5,53	117	845	138,5	1,5
		4	5,67	442	241	135	5
		5	6,12	457	+	135	5
		6	7,58	420	0	137	3
		7	7,53	421	0	140?	0?
		8	8,12	395	0	?	?

Si l'on suit les variations du pH des cultures on constate tout d'abord une acidification au troisième jour suivie bientôt d'une alcalinisation assez intense pour atteindre dans les cas les plus favorables un pH de 8,28 au huitième jour. On ne constate cependant dans ces conditions qu'une protéolyse peu importante qui se manifeste lorsque le glucose a disparu.

Fig.14

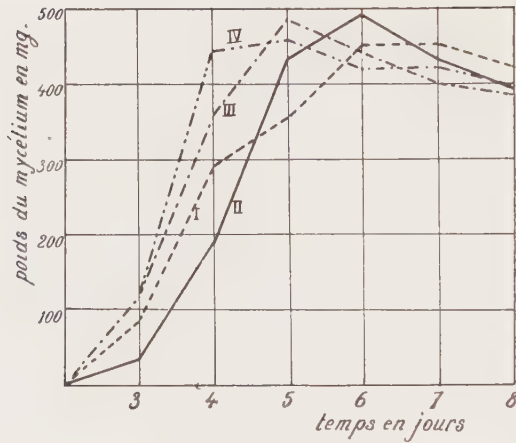


FIGURE 14. — Courbes de croissance sur un milieu avec acide oxalique en présence de glycolle et de glucose

I : pH initial 3,27 II : pH initial 3,71
 III : » » 4,70 IV : » » 5,68

Les courbes de consommation de l'acide oxalique dans les différentes séries (figures 14, 15, 16 et 17) montrent clairement que la consommation s'arrête lorsque le pH a dépassé la valeur 6-6, 2. Ce fait que l'on retrouve dans les quatre séries indique donc que les ions oxalate neutres ne sont pas absorbables par le *Penicillium glaucum*, même lorsque le glucose a disparu. La consommation de l'acide n'apparaît qu'avec la présence dans le milieu des ions oxalate acide.

Mais, si les conclusions sont nettes à ce point de vue, il est impossible de préciser le rôle des molécules entières.

Dans les cultures de 7 jours on trouve une consommation d'acide nettement inférieure à celle correspondante au sixième jour. BACH en cultivant l'*Aspergillus repens* sur un milieu au glycolle avait constaté une production tardive d'acide oxalique de neutralisation. Peut-être faut-il voir ici un phénomène analogue, à moins qu'il y aie, ce qui est possible, une erreur par excès dans le dosage de l'acide oxalique dûe aux pigments sécrétés par le mycélium.

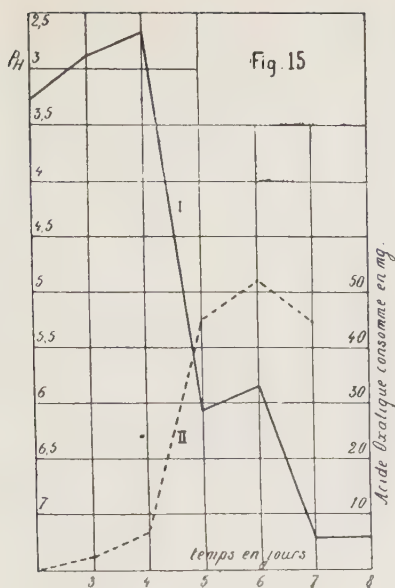


FIGURE 15. — pH initial 3,27
 Courbe I : Variations du pH en fonction du temps.
 Courbe II : Consommation de l'acide en fonction du temps.

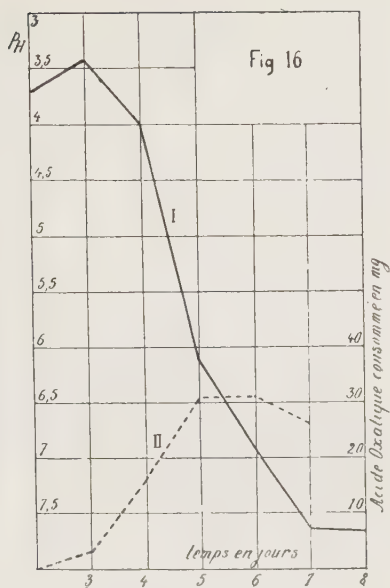


FIGURE 16. — pH initial 3,71
 Courbe I : Variations du pH en fonction du temps.
 Courbe II : Consommation de l'acide en fonction du temps.

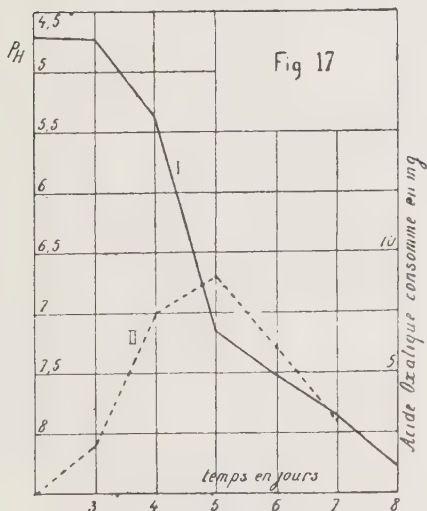


FIGURE 17. — pH initial 4,70
 Courbe I : Variations du pH en fonction du temps.
 Courbe II : Consommation de l'acide en fonction du temps.

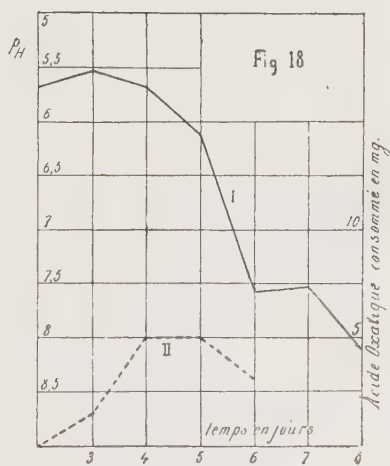


FIGURE 18. — pH initial 5,68
 Courbe I : Variations du pH en fonction du temps.
 Courbe II : Consommation de l'acide en fonction du temps.

2°) EXPÉRIENCES PAR LA MÉTHODE DES VOILES SOLIDES.

Il était intéressant de voir si la méthode des voiles solides conduisait aux mêmes résultats, et surtout d'essayer de préciser le rôle des molécules entières.

Choix du milieu de culture initial.

Un milieu au glyocolle m'a donné des voiles bien formés mais tellement plissés qu'ils étaient inutilisables.

J'ai employé dans les expériences qui vont suivre des voiles obtenus sur milieu à la carotte, et sur milieu de RAULIN dilué au demi. Je donnerai séparément les résultats obtenus avec chacun d'eux.

a) *Expériences avec des voiles obtenus sur un milieu à la carotte.*

Le milieu de culture initial était le même que celui employé pour l'*Aspergillus repens*. Je redonne ici sa composition :

Décoction de carottes à 500 g. p. 2000 cc.	1000 cc.
Constante minérale B	50 cc.
Glucose	50 g.
Citrate de Na	20 g.
¹ ClNa	20 g.
HCl N	10 cc.

Le *Penicillium glaucum* donne sur ce milieu après 12 jours à l'étuve à 22° (température optima de croissance) des voiles compacts mais en partie immergés, qui présentent un début de sporulation. Leur poids après dessiccation est d'environ 150 mg.

EXPÉRIENCE XXII (Tableau XXIII)

Milieu de substitution :

Oxalate de K N/2	6 cc. 25
Constante minérale A	5 cc.
Sol. de NO ₃ NH ₄ à 5 p. 100	5 cc.
Glucose	1 g. 125
HCl et NaOH	Variable
Eau distillée	qs 25 cc.

TABLEAU XXIII

Voiles lavés seulement à l'eau distillée.

Milieu de substitution complet.

Ac. oxalique initial 140 mg.

pH Variable

<i>pH</i> <i>initial</i>	<i>Durée</i> <i>en</i> <i>heures</i>	<i>pH</i> <i>final</i>	<i>Récolte</i> <i>en mg.</i>	<i>Ac. oxali-</i> <i>que final</i> <i>en mg.</i>	<i>Consom-</i> <i>mation</i>
3,65	8	3,77	145	139	1
	8	3,68	148	138	2
	24	3,45	190	137	3
	24	3,46	186	136	4
6,90	8	5,34	152	140	0
	8	5,45	148	140	0
	24	3,91	350	140	0
	24	4,02	338	140	0

De ces expériences il résulte que la consommation de l'acide oxalique est très faible, et se produit uniquement aux dépens de la molécule non dissociée, car elle ne s'observe que pour des pH inférieurs à 4, c'est-à-dire dans les milieux seuls où l'acide existe sous cette forme non ionisée.

En présence de glucose (tableau XXIII) le milieu de la seconde série passe de pH 6,9 à pH 4 sans manifester aucune consommation de l'acide. Celle-ci se produit seulement dans la série la plus acide où le pH passe de 3,65 à 3,45. Mais le milieu est toxique à ces pH, et on s'en rend compte en comparant, après 24 heures de contact, les variations de poids des mycéliums des deux séries : pour un gain de 40 mg. chez les premiers, les seconds ont augmenté de 200 mg.

EXPÉRIENCE XXIII (Tableau XXIV)

Milieu de substitution :

Oxalate de K N/2 6 cc. 25

Constante minérale A 5 cc.

Sol. de NO_3NH_4 à 5 p. 100 5 cc.

HCl Variable

Eau distillée qs 25 cc.

TABLEAU XXIV

Voiles lavés la dernière fois avec une solution isotonique.

Milieu de substitution sans glucose.

Ac. oxalique initial 140 mg.
 pH initial Variable
 Durée de contact 8 et 24 heures

Série	pH initial	Durée en heures	Récolte en mg.	pH final	Ac. oxalique final en mg.	Consommation
I	2,56	8	140	2,60	140	0
		8	145	2,59	140	0
		24	142	2,59	138	2
		24	143	2,61	139	1
II	2,98	8	142	2,99	139	1
		8	140	3	139	1
		24	139	3,10	138	2
		24	145	3,08	137	3
III	4,34	8	139	4,38	140	0
		8	143	4,42	140	0
		24	138	4,52	140	0
		24	140	4,56	140	0

Avec les milieux sans glucose j'ai constaté comme dans le cas de l'*Aspergillus repens*, que le comportement est le même qu'ils aient ou non été lavés avec une solution isotonique.

Les résultats obtenus avec les premiers sont exposés au tableau XXIV. Ils montrent que l'absorption de l'acide se fait dans les mêmes conditions que dans les milieux glucosés mais qu'elle est encore plus faible.

Ces résultats, en contradiction avec ceux des expériences en culture directe demandaient une confirmation. C'est ce qui m'a incité à chercher un milieu de culture initial plus favorable, pour voir s'il n'aurait pas une influence ultérieure sur les facultés d'assimilation du mycélium qu'il a produit.

b) *Expériences avec des voiles obtenus sur milieu de RAULIN.*

Le milieu de RAULIN dans sa formule originale donne avec le *Penicillium glaucum* des voiles qui se développent rapidement, mais qui deviennent très plissés avant même leur sporulation ; ils sont donc inutilisables.

Le même milieu dilué au demi convenait par contre parfaitement. L'obligation de diluer le milieu de culture pour obtenir des voiles non plissés était déjà apparue avec l'*Aspergillus niger*.

Composition du milieu de RAULIN dilué au demi :

Sucre candi	35 g.	Ac. tartrique	2 g.
NO ₃ NH ₄	2 g.	Phosphate de NH ₄ ..	0 g. 30
CO ₃ K ₂	0 g. 20	CO ₃ Mg	0 g. 125
SO ₄ (NH ₄) 2	0 g. 035	SO ₄ Zn	0 g. 035
SO ₄ Fe	0 g. 035	Silicate de potasse ..	0 g. 035
Eau distillée		1500 cc.	

On obtient ainsi après 7 jours à l'étuve à 22° un beau développement sous forme de voiles plans non immergés et présentant un début de sporulation. Leur poids sec est d'environ 300 mg., soit le double de celui des voiles développés sur milieu à la carotte.

On trouvera aux tableaux XXV et XXVI les résultats obtenus dans ces conditions.

EXPÉRIENCE XXIV (Tableau XXV)

Milieu de substitution :

Oxalate de K N/2	6 cc. 25
Constante minérale A	5 cc.
Sol. de NO ₃ NH ₄ à 5 p. 100	5 cc.
HCl et NaOH	Variable
Glucose	1 g. 125
Eau distillée	qs 25 cc.

TABLEAU XXV

Voiles développés sur RAULIN à 1/2 lavés à l'eau distillée.
Milieu de substitution complet.

Ac. oxalique initial 140 mg.
pH initial Variable

<i>pH</i> <i>initial</i>	<i>Durée</i> <i>en heures</i>	<i>pH</i> <i>final</i>	<i>Récolte</i> <i>en mg.</i>	<i>Ac. oxali-</i> <i>lique</i> <i>final en mg.</i>	<i>Consom-</i> <i>ption</i>
3,72	8	3,73	449	133	7
	8	3,70	432	134	6
	24	2,70	661	130	10
	24	2,72	638	129	11
6,81	8	6,31	547	140	0
	8	6,30	541	140	0
	24	4	776	131	9
	24	4,08	752	129,5	10,5

Il faut tout d'abord constater que ces mycéliums supportent beaucoup mieux que les précédents l'action toxique du milieu aux pH peu élevés. C'est ainsi qu'en présence de glucose le pH a pu passer de 3,72 à 2,70 avec une augmentation considérable du poids du mycélium.

Mais le fait essentiel réside dans ce que ces voiles sont capables d'absorber les ions oxalate acide. On peut voir (tableau XXVI). en effet, que la consommation importante dans les milieux les plus acides diminue progressivement avec la concentration en ions H pour s'annuler vers pH 6,25, c'est-à-dire lorsque les ions oxalate acide ont disparu du milieu. On retrouve donc les résultats identiques à ceux exposés au début de ce chapitre pour les expériences en culture directe.

Ainsi donc les mycéliums d'un même champignon se comportent de façon bien différente suivant le milieu initial qui les a produits.

Cette influence du milieu de culture sur l'organisme qui s'y développe est aujourd'hui un fait connu et très travaillé. On trouverait dans la littérature toute une série d'expériences dans ce sens, et notamment sur les variations des propriétés oxydo-réductrices des Bactéries (BRAUN et WORDERHOFF, 1933).

EXPÉRIENCE XXV (Tableau XXVI)

Milieu de substitution :

Oxalate de K N/2	6 cc. 25
Constante minérale A	5 cc.
Sol. de NO_3NH_4 à 5 p. 100	5 cc.
HCl	Variable
Eau distillée	qs 25 cc.

TABLEAU XXVI

Voiles développés sur milieu de RAULIN dilué au demi, lavés la dernière fois avec une solution isotonique.

Milieu de substitution sans glucose.

Ac. oxalique initial	140 mg.
pH initial	Variable
Durée de contact	8 et 24 heures

Série	pH initial	Durée en heures	Récolte en mg.	pH final	Ac. oxalique final en mg.	Consommation en mg.
I	3,08	8	344	3,21	135	5
		8	323	3,18	135	5
		24	343	3,55	126	14
		24	336	3,53	127	13
II	4,36	8	315	4,48	137	3
		8	308	4,52	137,5	2,5
		24	322	4,86	131	9
		24	314	4,88	130	10
III	5,82	8	302	5,99	138	2
		8	308	6	138	2
		24	300	6,24	136	4
		24	305	6,22	136	4
VI	6,45	8	320	6,52	140	0
		8	318	6,48	140	0
		24	310	6,62	140	0
		24	307	6,56	140	0

Cependant ce cas particulier de l'influence du milieu sur l'absorption des acides par les champignons ne semble pas avoir été signalé jusqu'à maintenant. Il y aurait intérêt à reprendre ces expériences avec d'autres champignons cultivés systématiquement sur plusieurs milieux différents.

Il est possible, d'ailleurs, que ce phénomène que je n'ai rencontré au cours de ces recherches qu'avec le *Penicillium glaucum*, ne soit particulier qu'à lui, et tienne non pas à une action prolongée du milieu de culture initial, mais à un état physique différent des mycéliums. J'ai fait remarquer, en effet, que les voiles produits sur milieu à la carotte étaient immergés et que les autres ne l'étaient pas. C'est peut-être au contact plus ou moins large avec l'atmosphère qu'il faut attribuer les différences constatées.

CONCLUSIONS DE CE CHAPITRE.

I. — *Expériences en culture directe :*

Le *Penicillium glaucum* consomme les ions oxalate acide. Il est difficile de préciser le rôle des molécules entières.

II. — *Expériences en culture indirecte :*

a) Voiles développés sur milieu à la carotte.

La consommation très faible se fait uniquement aux dépens des molécules non dissociées.

b) Voiles développés sur milieu de RAULIN dilué au demi.

On retrouve cette fois les mêmes résultats qu'en culture directe, c'est-à-dire la consommation des ions oxalate acide.

Il y a donc contradiction entre les résultats fournis par des voiles d'origine différente.

Il est permis de penser que les mycéliums sont normalement perméables aux deux formes : acide oxalique moléculaire et ion oxalate acide mais que dans ces conditions la pénétration de molécules entières, bien plus rapide que celle des ions, est masquée par leur toxicité même. Les voiles développés sur milieu à la carotte n'auraient plus qu'une perméabilité diminuée, qui se traduirait par le passage des seules molécules entières.

CHAPITRE IV. — CONSOMMATION DE L'ACIDE OXALIQUE PAR LE *CUNNINGHAMELLA ECHINULATA* THAXTER

La résistance de ce champignon aux divers agents toxiques est de l'ordre de celle du *Penicillium glaucum*. Je n'ai pas trouvé dans la littérature de travaux de ce genre le concernant.

Je n'ai pas fait avec lui d'expériences en culture directe.

EXPÉRIENCES AVEC LA MÉTHODE DES VOILES SOLIDES.

Milieu de culture initial :

Le milieu utilisé a été le même que pour *l'Aspergillus repens*.

On obtient après 7 jours de culture à l'étuve à 24° (température optima) des voiles compacts non immergés et présentant un début de sporulation. Leur poids sec est d'environ 220 mg.

Ce sont les voiles de cet âge que j'ai utilisés dans les expériences qui vont suivre.

Les résultats obtenus sont résumés aux tableaux XXVII et XXVIII.

L'effet toxique, en présence de glucose, se fait sentir aux environs de pH 3. J'ai constaté, en effet, qu'à ce pH, il ne permet plus la culture à partir de la spore, tandis qu'il la permet encore à pH 3,20.

Sur un milieu complet la consommation est nulle aux pH supérieurs à 4 ; le *Cunninghamella echinulata* ne peut donc assimiler que les molécules entières d'acide oxalique. L'assimilation est d'ailleurs très faible, puisqu'elle ne dépasse pas 9 mg. après 24 heures de contact.

En l'absence de glucose, le milieu de substitution est si toxique que le champignon est incapable d'assimiler l'acide.

J'ai constaté en outre que les résultats étaient les mêmes avec des voiles lavés seulement à l'eau distillée, et avec les voiles lavés la dernière fois avec une solution isotonique.

EXPÉRIENCE XXVI (Tableau XXVII)

Milieu de substitution :

Oxalate de K N/2	6 cc. 25
Constante minérale A	5 cc.
Sol. de NO_3NH_4 à 5 p. 100	5 cc.
Glucose	1 g. 125
HCl et NaOH	Variable
Eau distillée	qs 25 cc.

TABLEAU XXVII

Voiles lavés à l'eau distillée pendant 24 heures.

Milieu de substitution complet.

Ac. oxalique initial	140 mg.
pH initial	Variable
Durée de contact	8 et 24 heures

Série	pH initial	Durée en heures	pH final	Récolte en mg	Ac. oxalique final en mg.	Consommation en mg.
I	3,20	8	3,21	220	135	5
		8	3,19	256	137	3
		24	2,94	230	131	9
		24	2,95	264	132	8
II	3,63	8	3,55	240	139	1
		8	3,48	248	138	2
		24	3,01	300	134	6
		24	3,07	292	135	5
III	5,23	8	4,39	253	140	0
		8	4,48	248	140	0
		24	3,34	354	138	2
		24	3,45	337	139	1
IV	6,71	8	5,30	247	140	0
		8	5,28	254	140	0
		24	3,89	339	140	0
		24	3,76	343	140	0

EXPÉRIENCE XXVII (Tableau XXVIII, Figure 19)

Milieu de substitution :

Oxalate de K N/2	6 cc. 25
Constante minérale A	5 cc.
Sol. de NO_3NH_4 à 5 p. 100	5 cc.
HCl	Variable
Eau distillée	qs 25 cc.

TABLEAU XXVIII

Voiles lavés la dernière fois avec une solution isotonique.
Milieu de substitution sans glucose.

Ac. oxalique initial	140 mg.
pH initial	Variable
Durée de contact	8 et 24 heures

Série	pH initial	Durée en heures	Récolte final	pH en mg.	Ac. oxalique final en mg.	Consommation en mg.
I	2,56	8	2,58	225	140	0
		8	2,58	228	140	0
		24	2,58	222	140	0
		24	2,58	224	140	0
II	3,08	8	3,04	205	140	0
		8	3,06	210	139	1
		24	3,04	209	139	1
		24	3,04	215	139	1
III	5,33	8	5,30	210	140	0
		8	5,30	206	140	0
		24	5,24	208	140	0
		24	5,28	208	140	0

CONCLUSIONS DE CE CHAPITRE.

L'acide oxalique est toxique pour le *Cunninghamella echinulata*, et celui-ci ne peut l'assimiler qu'en présence de glucose.

Cette consommation ne se fait, d'ailleurs, qu'aux dépens de la molécule non dissociée uniquement.

CHAPITRE V. — CONSOMMATION DE L'ACIDE OXALIQUE
PAR LE *MUCOR CIRCINELLOIDES* VAN TIEGHEM

Je donnerai maintenant brièvement le résultat d'une expérience en culture directe faite avec le *Mucor circinelloïdes* (Van Tieghem).

Ce champignon est très sensible aux acides et aux ions H. Il donne des voiles épais, surmontés d'un gazon de sporangiophores qui remplit la fiole de culture ; il est impossible de les manipuler pour les expériences en culture indirecte. Il faut remarquer d'ailleurs à ce sujet que le dispositif de LUTZ légèrement modifié nous aurait probablement permis une expérimentation correcte.

Les résultats de cette expérience en culture directe sont rapportés au tableau XXIX. Le milieu s'est montré toxique à pH 3 (série I) et le champignon ne s'est pas développé. La culture est encore très lente à un pH initial de 3,63 (série II), puisque je n'ai obtenu de mycélium bien formé qu'au neuvième jour.

Bien que cette expérience, comme toutes celles en culture directe, soit peu concluante, on peut voir cependant que l'absorption de l'acide cesse lorsque le pH dépasse 6, c'est-à-dire lorsque les ions oxalate acide disparaissent du milieu.

EXPÉRIENCE XXVIII (Tableau XXIX)

Milieu de culture :

Oxalate de K N/2	250 cc.
NO ₃ K	10 g.
Glucose	50 g.
Constante minérale B	50 cc.
HCl et NaOH	Variable
Eau distillée	qs 1000 cc.

TABLEAU XXIX

Le milieu a été ajusté à 4 pH différents : 3, 3,63, 4,88 et 6,08 ;
et réparti à la dose de 25 cc.

Ac. oxalique initial 140 mg.
Glucose initial 1 g. 125
pH initial Variable
Durée Variable

Série	pH initial	Durée en jours	Récol. en mg.	pH final	Gluc. final en mg.	Ac. oxali- que final en mg.	Consom- mation en mg.
I	3	Le mycélium ne s'est pas développé.					
II	3,63	7	12,5	3,89	831	137	3
		9	16	4,02	700	135	5
		11	33	4,11	406	133	7
III	4,88	7	22	5,18	864	137	3
		9	48,5	6	502	131,5	8,5
		11	68	5,90	284	133	7
IV	6,08	7	28	6,02	554	132	8
		9	104	7,30	Trace	133	7
		11	100	7,37	0	133	7

DEUXIÈME PARTIE

ETUDE DE LA CONSOMMATION DE L'ACIDE LACTIQUE

L'acide lactique est, en général, un bon aliment, et ne possède qu'une toxicité relativement faible.

Cependant BOAS et LEBERLE, en ajustant deux milieux, l'un avec SO_4H_2 , le second avec l'acide lactique, ont trouvé que le *Mycoderma aceti* se développait sur le premier et pas sur le deuxième.

Pour BACH, qui cultive l'*Aspergillus repens* sur lactate d'ammoniaque et saccharose, l'acide lactique n'est pas sensiblement toxique. Mais dans une note sur la toxicité des acides acétique et lactique pour les bactéries, cet auteur trouve chez ce dernier une toxicité sensiblement proportionnelle à la quantité de molécules non dissociées présentes dans le milieu.

L'acide lactique, second terme de la série des acides alcool, a pour formule $\text{CH}_3\text{-CHOH-CO}_2\text{H}$. J'ai utilisé dans ces expériences l'acide racémique officinal purifié. C'est un acide relativement fort. Sa constante de dissociation est $K = 1,38.10^{-4}$.

Son point de demi-virage défini par la formule $\text{pH} = \log \frac{1}{K}$ a pour valeur 3,865.

Je donne, tableau XXX, les valeurs de l'acide dissocié et du reste de dissociation q en fonction du pH, calculée d'après la formule de dissociation. Les valeurs de q et de a ont été conventionnellement rapportées à 100.

TABLEAU XXX

pH	q	a	pH	q	a
2,6	94,8	5,2	4,6	15,4	84,6
2,8	92	8	4,8	10,3	89,7
3	87,9	12,1	5	6,8	93,2
3,2	82,1	17,9	5,2	4,4	95,6
3,4	74,3	25,7	5,4	2,8	97,2
3,6	64,6	35,4	5,6	1,8	98,2
3,8	53,5	46,5	5,8	1,13	98,87
4	42	58	6	0,72	99,28
4,2	31,4	68,6	6,2	0,45	99,55
4,4	22,4	77,6	6,4	0,28	99,72

Fig. 19

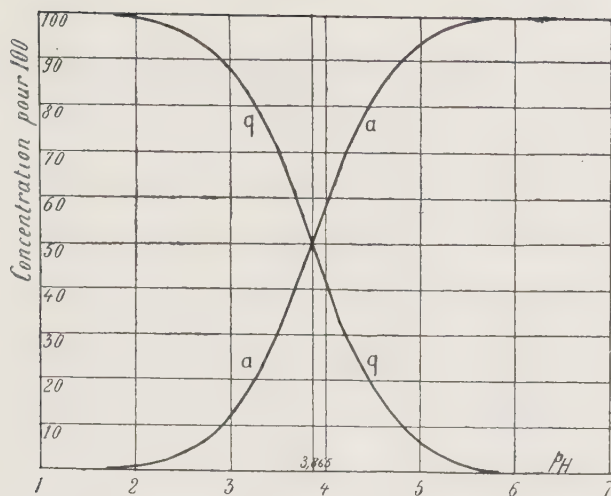


FIGURE 19 .— Courbe de dissociation de l'acide lactique en fonction du pH

Ce corps a une grande importance en physiologie. Il résulte comme la plupart des acides organiques, de la combustion incomplète des sucres. C'est un produit presque constant de la fermentation par les levures et par de nombreuses bactéries.

Sa consommation a fait l'objet de nombreux travaux. D'après BERNHAUER, elle se ferait soit par formation d'acide propionique, soit par scission de la molécule en acétaldéhyde et CO_2 .

Nous avons vu précédemment que la présence de glucose gênait beaucoup le dosage de l'acide lactique. J'ai donc été contraint de n'employer que l'acide seul comme source de carbone. Mais de tels milieux ne permettent qu'un très mauvais développement des divers champignons utilisés ; c'est pourquoi les expériences qui vont suivre ont été faites avec la méthode des voiles solides.

CHAPITRE I. — CONSOMMATION DE L'ACIDE LACTIQUE PAR L'*ASPERGILLUS NIGER* VAN TIEGHEM

J'ai fait réagir les voiles d'*Aspergillus niger* sur des milieux N/8 en acide lactique contenant les éléments minéraux indispensables et NO_3NH_4 comme source d'azote.

La courbe d'ajustage de ce milieu (figure 20) m'a permis d'expérimenter facilement à différents pH.

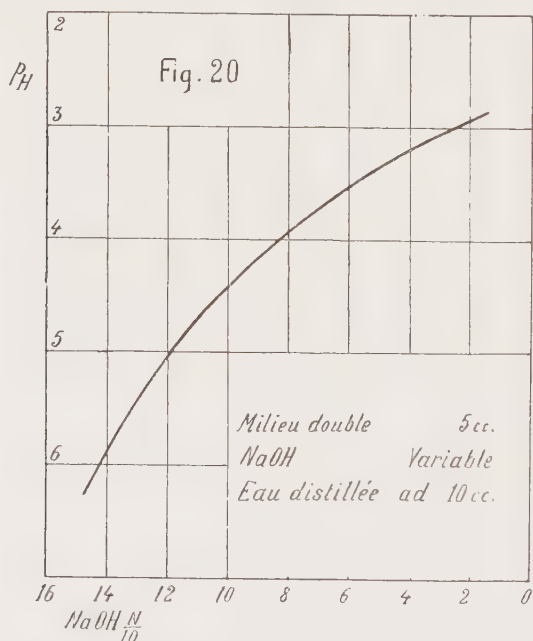


FIGURE 20. — Courbe d'ajustage des milieux de substitution

EXPÉRIENCE XXX (Tableau XXXI, Figure 21)

Milieu de culture initial :

Constante minérale A	5 cc.
Sol. de NO_3NH_4 à 5 p. 100	5 cc.
Glucose	1 g. 125
Eau distillée	qs. 25 cc.

Milieu de substitution :

Ac. lactique N/2	6 cc. 25
Constante minérale A	5 cc.
Sol. de NO_3NH_4 à 5 p. 100	5 cc.
NaOH	Variable
Eau distillée	qs. 25 cc.

TABLEAU XXXI

Voiles de 5 jours à l'étuve à 30°, lavés 24 heures à l'eau distillée.

Ac. lactique initial	280 mg.
pH initial	Variable
Durée de contact	8 et 24 heures

Série	pH initial	Durée en heures	pH final	Récolte en mg.	Ac. lactique final en mg.	Consommation en mg.
I	2,63	8	2,72	200	275	5
		8	2,72	198	274	6
		24	2,57	223	149	131
		24	2,52	218	153	127
II	5,07	8	5,17	196	274	6
		8	5,08	190	275	5
		24	5,70	194	252	28
		24	5,83	176	247	33
III	5,82	8	5,93	165	277	3
		8	5,94	180	276	4
		24	6,30	176	263	17
		24	6,26	162	268	12
IV	6,13	8	6,15	195	277	3
		8	6,16	193	276	4
		24	6,22	188	270	10
		24	6,20	198	271	9

Aux pH acides la culture est luxuriante, et le mycélium augmente de poids de façon sensible.

La consommation de l'acide est alors très importante (50 p. 100

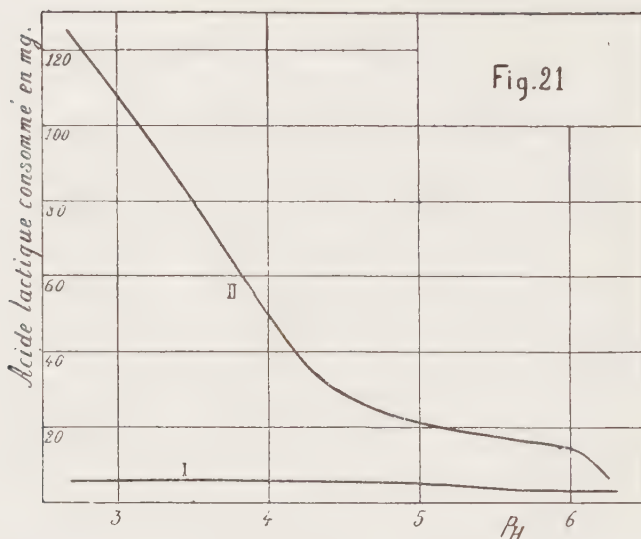


FIGURE 21. — Consommation de l'acide lactique par l'*Aspergillus niger* en fonction du pH

I : Consommation après 8 heures de contact

II : Consommation après 24 heures de contact.

environ de la quantité mise en œuvre). Mais elle diminue rapidement lorsque le pH augmente ; elle n'est plus à pH 6,20 que du 1/30 ième environ de l'acide initial.

En se reportant à la courbe de dissociation de l'acide lactique (figure 19) on s'aperçoit que la consommation est très étroitement liée à la quantité de molécules non dissociées présentes dans le milieu.

Aux pH élevés, la consommation plus forte que ne le voudrait la courbe de dissociation, s'explique très bien par le fait qu'aussitôt l'absorption par le champignon de la petite quantité de molécules non dissociées (0,45 p. 100 à pH 6,20) il s'en reforme des quantités équivalentes en vertu de la loi d'action de masses.

Il est à remarquer que la consommation de l'acide ne commence pas tout de suite, car elle est très faible après 8 heures de contact et de l'ordre des erreurs d'expériences. Il était donc inutile dans ces conditions d'utiliser des voiles lavés la dernière fois avec une solution isotonique au milieu de substitution.

CHAPITRE II. — CONSOMMATION DE L'ACIDE LACTIQUE PAR L'*ASPERGILLUS REPENS* DE BARY

Les résultats obtenus avec l'*Aspergillus repens* sont résumés au tableau XXXII.

On s'aperçoit que, quel que soit le pH, ce champignon est incapable de consommer l'acide lactique.

Ces résultats sont en accord avec les expériences de BACH (loc. cit.) quand il ne trouve à l'acide lactique qu'une toxicité pour l'*Aspergillus repens* uniquement en rapport avec les ions H du milieu.

Ce fait n'est pas isolé, et nous avons vu au début de ce travail que pour SMITH l'action de l'acide lactique est nulle sur les œufs d'*Asteria* et d'*Arbacia*.

Ce phénomène est-il dû à l'imperméabilité de la membrane à l'acide, ou bien à l'impossibilité pour le mycélium de la brûler ?

Il est évidemment difficile de se prononcer de façon certaine pour l'une ou l'autre de ces hypothèses. Cependant le fait que pour BACH et SMITH l'acide lactique ne possède pas sensiblement de toxicité propre, semble bien indiquer qu'il est arrêté par la membrane cellulaire, car on voit mal ce qui l'empêcherait d'exercer son action si elle est due, comme le pense LILLIE, et la plupart des auteurs, à l'effet des ions H résultant de sa dissociation à l'intérieur de la cellule.

EXPÉRIENCE XXX (Tableau XXXII)

Milieu de culture initial :

Décoction de carotte à 500 g.	
p. 2000	50 cc.
Constante minérale B	2 cc. 5
Glucose	2 g. 50
Citrate de Na et NaCl	1 g.
HCl N	0 cc. 5

Milieu de substitution :

Ac. lactique N/2	6 cc. 25
Constante minérale A	5 cc.
Sol. de NO_3NH_4 à 5 p. 100	5 cc.
NaOH	Variable
Eau distillée	qs 25 cc.

TABLEAU XXXII

Voiles de 7 jours à l'étuve à 27°, lavés 24 heures à l'eau distillée.

Ac. lactique initial 280 mg.

pH initial Variable

Durée de contact 8 et 24 heures

<i>Série</i>	<i>pH initial</i>	<i>Durée en heures</i>	<i>pH final</i>	<i>Récolte en mg.</i>	<i>Ac. lactique final en mg.</i>	<i>Consom- mation en mg.</i>
I	3,52	8	3,55	138	279	1
		8	3,54	145	279	1
		24	3,54	150	279	1
		24	3,54	148	280	0
II	5,37	8	5,60	135	280	0
		8	5,58	138	281	0
		24	5,88	140	279	1
		24	5,88	138	280	0
III	5,55	8	5,75	141	278	2
		8	5,72	145	280	0
		24	6,26	148	278	2
		24	6,25	140	279	1
IV	6,35	8	6,54	139	280	0
		8	6,52	142	279	1
		24	6,66	141	278	2
		24	6,68	140	279	1

CHAPITRE III. — CONSOMMATION DE L'ACIDE LACTIQUE PAR LE *PENICILLIUM GLAUCUM* LINK

La consommation de l'acide lactique par le *Penicillium glaucum* est très rapide dans les milieux acides. Comme elle diminue rapidement lorsque le pH augmente, en suivant de très près la courbe de dissociation de l'acide on peut conclure qu'elle se fait uniquement aux dépens de la molécule non dissociée.

Cependant elle est encore nette alors que les molécules entières ne sont plus qu'à l'état de traces ; elle atteint, en effet, encore 1/30 ième de l'acide mis en œuvre à pH 6,6 alors que la quantité de molécules n'est plus que de 0,2 p. 100. Ce fait, que j'avais déjà signalé à propos de l'*Aspergillus niger*, est ici plus marqué à cause de l'absorption plus grande de l'acide, mais l'explication semble en être la même.

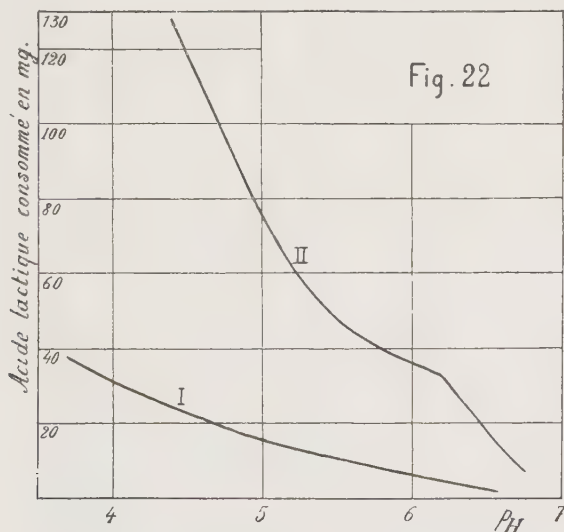


FIGURE 22. — Consommation de l'acide lactique
par le *Penicillium glaucum* en fonction du pH

I : Consommation après 8 heures de contact.

II : Consommation après 24 heures de contact.

EXPÉRIENCE XXXI (Tableau XXXIII, Figure 22)

Milieu de culture initial :

Milieu de RAULIN dilué à 1/2.

Milieu de substitution :

Ac. lactique N/2	6 cc. 25
Constante minérale A	5 cc.
Sol. de NO_3NH_4 à 5 p. 100	5 cc.
NaOH	Variable
Eau distillée	qs 25 cc.

TABLEAU XXXIV

Voiles de 7 jours à l'étuve à 22°, lavés 24 heures à l'eau distillée.

Ac. lactique initial

280 mg.

pH initial

Variable

Durée de contact

8 et 24 heures

Série	pH initial	Durée en heures	pH final	Récolte en mg	Ac. lactique final en mg.	Consommation en mg.
I	3,90	8	4	308	246	34
		8	4,02	306	252	28
		24	4,92	318	155	125
		24	4,87	315	152	128
II	4,67	8	5,04	315	268	12
		8	5,02	307	266	14
		24	6,19	300	229	51
		24	6,22	305	231	49
III	5,84	8	6,07	312	272	8
		8	6,12	315	274	6
		24	6,58	320	246	34
		24	6,52	308	248	32
IV	6,49	8	6,61	325	278	2
		8	6,60	320	277	3
		24	6,82	312	272	8
		24	6,78	318	270	10

On remarquera dans le cas du *Penicillium*, que l'absorption est très précoce et sensiblement proportionnelle au temps de contact. Cela se traduit par deux courbes sensiblement homologues dans la représentation graphique de la consommation en fonction du pH, après 8 et 24 heures de contact. (Figure 22).

CHAPITRE IV. — CONSOMMATION DE L'ACIDE LACTIQUE PAR LE CUNNINGHAMELLA ECHINULATA THAXTER

Comme l'acide oxalique l'acide lactique est absorbé difficilement par ce champignon. La consommation suit cependant les mêmes lois qu'avec l'*Aspergillus niger* et le *Penicillium glaucum*.

La pénétration de l'acide doit être très lente car la consommation après 8 heures de contact est à peu près nulle et de l'ordre des erreurs d'expérience.

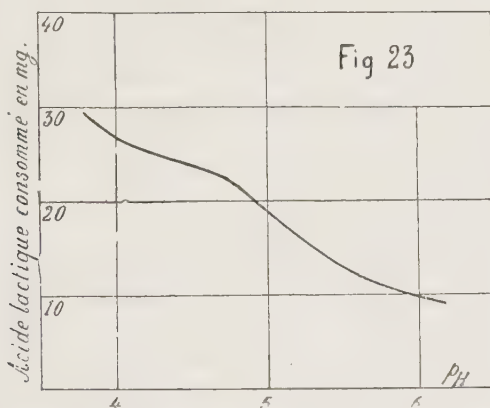


FIGURE 23. — Consommation de l'acide lactique par le *Cunninghamella echinulata* en fonction du pH

EXPÉRIENCE XXXII (Tableau XXXIV, Figure 23)

Milieu de culture initial :

Milieu à la carotte de même composition que celui utilisé pour l'*Aspergillus repens*.

Milieu de substitution :

Ac. lactique N/2	6 cc. 25
Constante minérale A	5 cc.
Sol. de NO_3NH_4 à 5 p. 100	5 cc.
NaOH	Variable
Eau distillée	qs 25 cc.

TABLEAU XXXIV

Voiles de 7 jours à l'étuve à 24°, lavés 24 heures à l'eau distillée.

Ac. lactique initial 280 mg.
 pH initial Variable
 Durée de contact 8 et 24 heures

Série	pH initial	Durée en heures	Récolte en mg.	pH final	Ac. lactique final en mg.	Ionson- nation en mg.
I	3,87	8	190	3,96	280	0
		8	202	3,94	279	1
		24	197	4	252	28
		24	210	3,98	253	27
II	4,64	8	196	4,71	279	1
		8	198	4,72	278	2
		24	202	4,83	257	23
		24	196	4,83	258	22
III	5,60	8	195	5,57	279	1
		8	205	5,62	280	0
		24	206	5,58	268	12
		24	202	5,59	268	12
IV	6,13	8	192	6,12	278	1
		8	201	6,12	279	2
		24	205	6,10	270	10
		24	204	6,11	271	9

RESUME DE L'ETUDE SUR LA CONSOMMATION DE L'ACIDE LACTIQUE

Des quatre champignons utilisés dans ces expériences, trois : *Aspergillus niger*, *Penicillium glaucum* et *Cunninghamella echinulata* sont capables d'absorber l'acide lactique, avec une rapidité qui varie d'ailleurs avec chacun d'eux. Avec le quatrième : *Aspergillus repens*, la consommation est nulle.

L'absorption est tardive avec *Aspergillus niger* et *Cunninghamella echinulata*, puisqu'elle est à peu près nulle après 8 heures de contact des voiles sur le milieu d'étude. Elle est par contre, sensiblement proportionnelle au temps avec *Penicillium glaucum*.

La consommation, quand elle a lieu, se fait aux dépens des molécules non dissociées d'acide lactique.

TROISIÈME PARTIE

ETUDE DE LA CONSOMMATION DE L'ACIDE ACETIQUE

La toxicité de l'acide acétique a attiré l'attention de nombreux chercheurs. Si dans les milieux voisins de la neutralité il se montre un bon aliment, il devient rapidement toxique lorsque le pH s'abaisse.

C'est ainsi que REICHEL le trouve plus toxique que HCl sur le *Penicillium glaucum*.

La plupart des auteurs ont rapporté cette action aux molécules non dissociées.

BACH, (loc. cit.) constate qu'en milieu neutre il est un bon aliment pour l'*Aspergillus repens*, mais que la culture s'arrête lorsque la concentration de l'acide à l'état moléculaire atteint dans le milieu une valeur comprise entre 0,015 M et 0,029 M par litre.

Cependant BIAL recherchant son action sur la fermentation alcoolique pense qu'elle est due uniquement aux ions H. dissocié.

D'après SCUDDER sa constante de dissociation est $K = 1,8 \cdot 10^{-5}$.

Son point de demi-virage est à $\text{pH} = \log \frac{1}{K} = 4,74$.

On trouvera tableau XXXV la concentration respective des molécules non dissociées et des ions aux différents pH, calculée d'après ces données. La figure 24 donne la représentation graphique de ces résultats.

TABLEAU XXXV

pH	q	a	pH	q	a
3,2	97,2	2,8	5	35,7	64,3
3,4	95,8	4,2	5,2	26,1	73,9
3,6	93,4	6,6	5,4	18,2	81,8
3,8	89,9	10,1	5,6	12,3	87,7
4	84,8	15,2	5,8	8,1	91,9
4,2	77,9	22,1	6	5,3	94,7
4,4	69	31	6,2	3,5	96,5
4,6	58,4	41,6	6,4	2,2	97,8
4,8	46,9	53,1	6,6	1	99

Fig. 24

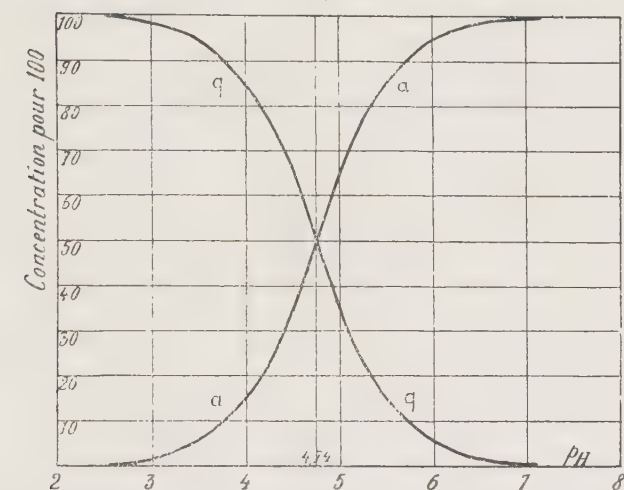


FIGURE 24. — Courbes de dissociation de l'acide acétique

En présence de NO_3NH_4 comme source d'azote, j'ai pu, fortuitement, mettre en évidence la formation de nitrites. Je me suis aperçu en effet, en voulant doser l'acide acétique dans les milieux d'étude après contact avec les voiles d'*Aspergillus niger*, d'*Aspergillus repens* et de *Penicillium glaucum* obtenus dans les conditions habituelles, que la première fraction de distillat conduisait à des chiffres plus forts que les suivantes. Recherchant la cause de cette erreur, j'ai constaté que cette fraction donnait une réaction fortement positive à la diphenylamine : il ne pouvait s'agir que des nitrites puisque l'acide nitrique ne passe pas à la distillation dans ces conditions.

On admet depuis SCHLOESING et MUNTZ (1878) que les nitrites sont le terme intermédiaire de l'assimilation des nitrates, avant la transformation finale en ammoniacque. Sans vouloir entrer dans les détails, je citerai à l'appui de cette théorie qui exige un remaniement moléculaire absorbant nécessairement de l'énergie, les travaux de PURIEWITCH qui a montré que l'assimilation de l'azote nitrique s'accompagne d'une perte d'énergie considérable.

RACIBORSKI, d'autre part, indique que l'addition d'un oxydant (ClO_3K) arrête l'assimilation des nitrates tandis qu'un réducteur, au contraire, la favorise.

Les nitrites, très instables en milieux acides, n'ont jamais pu de ce fait être caractérisés dans les cultures ordinaires. Mais RITTER a trouvé, avec des cultures d'*Aspergillus niger* et d'*Aspergillus glaucus*, que si l'on maintient le milieu neutre ou alcalin soit par addition de craie, soit en remplaçant le sucre par des sels d'acides organiques, on peut caractériser les nitrites sur des milieux nitrates.

Je n'ai pas fait l'étude systématique du phénomène, mais j'ai pu constater dans mes expériences, dès pH 6,2-6,3, c'est-à-dire dans des milieux encore acides, une formation de nitrites assez importante

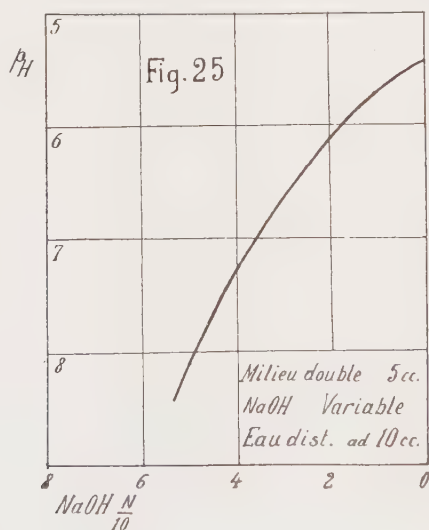


FIGURE 25. — Courbe d'ajustage des milieux de substitution à l'acide acétique

pour fausser le dosage de l'acide acétique. Il est probable qu'à des pH bien inférieurs on peut déceler son existence à l'état de traces.

Pour remédier à cette cause d'erreur, j'ai remplacé dans les expériences qui vont suivre NO_3NH_4 par $\text{SO}_4(\text{NH}_4)^2$.

Pour éviter la formation possible d'acides organiques à partir du glucose, fait qui pouvait fausser le dosage, je l'ai supprimé des milieux et j'ai dû pour cette raison utiliser seulement la méthode des voiles solides.

CHAPITRE I. — CONSOMMATION DE L'ACIDE ACETIQUE PAR L'ASPERGILLUS NIGER

La souche d'*Aspergillus niger* qui m'avait servi quelques mois auparavant pour les expériences avec les acides oxalique et lactique, ayant été détruite accidentellement, ces expériences ont été faites avec une nouvelle souche, qui, cultivée sur le même milieu initial, m'a donné des voiles plus épais et plus denses que la précédente.

Les résultats rapportés au tableau XXXVI montrent que la consommation de l'acide est très énergique témoignant de sa grande valeur alimentaire.

Il faut remarquer ici, comme dans les expériences correspondantes avec l'acide lactique, que l'absorption n'est pas précoce et qu'elle est très faible dans les 8 premières heures par rapport à celle des 16 heures suivantes.

EXPÉRIENCE XXXIII (Tableau XXXVI, Figure 26)

Milieu de culture initial :

Constante minérale A	5 cc.
Sol. de NO_3NH_4 à 5 p. 100	5 cc.
Glucose	1 g. 125
Eau distillée	qs 50 cc.

Milieu de substitution :

Acétate de Na N/2	6 cc. 25
Constante minérale A	5 cc.
Sol. de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ à 5 p. 100	5 cc.
NaOH	Variable
Eau distillée	qs 25 cc.

TABLEAU XXXVI

Voiles de 5 jours à l'étuve à 30°, lavés 24 heures à l'eau distillée.

Ac. acétique initial 187 mg.
 pH initial Variable
 Durée de contact 8 et 24 heures

<i>Série</i>	<i>pH initial</i>	<i>Durée en heures</i>	<i>pH final</i>	<i>Récolte en mg.</i>	<i>Ac. acétique final en mg.</i>	<i>Consommation en mg.</i>
I	5,92	8	6,02	416	162	25
		8	6,02	385	164	23
		24	6,88	402	26	161
		24	7,03	412	24	163
II	6,55	8	6,61	410	161	26
		8	6,62	416	161	26
		24	7,49	427	28	159
		24	7,51	412	31	156
III	6,91	8	6,89	420	162	23
		8	6,88	418	162	25
		24	7,58	405	63	124
		24	7,58	412	66	121
IV	7,53	8	7,15	418	163	24
		8	7,38	412	163	24
		24	7,70	400	56	131
		24	7,68	408	63	124

Comme il fallait s'y attendre par suite de l'absorption considérable des radicaux acides, le milieu s'alcalinise rapidement, car en l'absence de glucose la consommation de l'azote ammoniacal est faible et le champignon ne peut pas fabriquer d'acide de neutralisation.

L'acide acétique est consommé de façon à peu près équivalente à tous les pH, même lorsque théoriquement les molécules entières ont disparu du milieu.

Fig 26

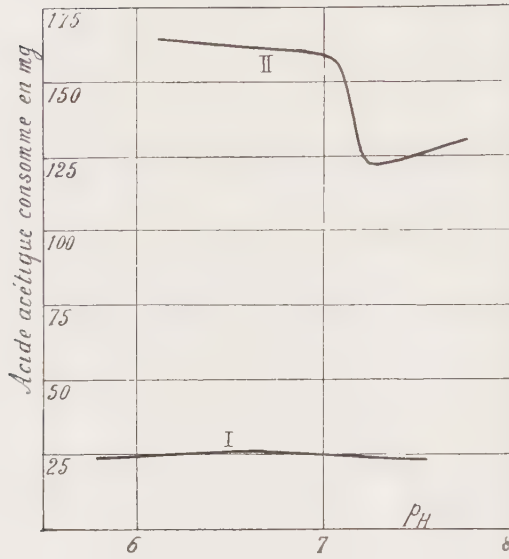


FIGURE 26. — Consommation de l'acide acétique par l'*Aspergillus niger* en fonction du pH

I : Après 8 heures de contact.

II : Après 24 heures de contact.

CHAPITRE II. — CONSOMMATION DE L'ACIDE ACETIQUE PAR L'ASPERGILLUS REPENS

Dans les conditions optima (tableau XXXVII, séries 2 et 3) l'acide acétique se montre un excellent aliment pour l'*Aspergillus repens*, car les voiles ont augmenté très sensiblement de poids. Dans la série la plus acide (pH 5,7) nous sommes aux environs du pH limite déterminé par BACH où un milieu à cette concentration en acide acétique ne permet plus la culture, et c'est à ce fait qu'il faut rapporter la consommation plus faible dans cette série.

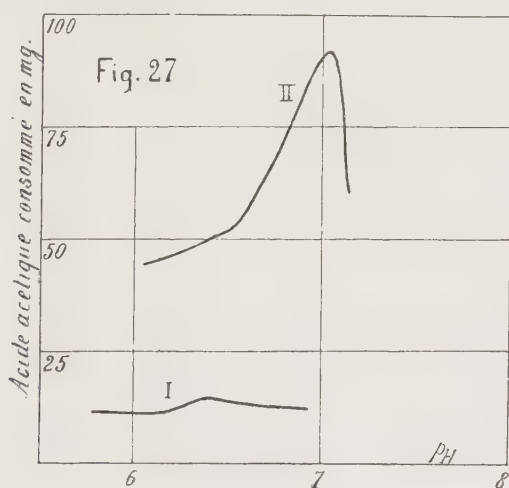


FIGURE 27. — Consommation de l'acide acétique par l'*Aspergillus repens* en fonction du pH

I : Après 8 heures de contact.

II : Après 24 heures de contact.

Comme dans les expériences avec *Aspergillus niger*, la consommation ne suit pas la courbe de dissociation de l'acide.

EXPÉRIENCE XXXIV (Tableau XXXVII, Figure 27)

Milieu de culture initial :

Décoction de carotte à 500 g. p. 2000	50 cc.
Constante minérale B	2 cc. 5
Glucose	2 g. 50
Citrate de Na et NaCl aa	1 g.
HCl N	0 cc. 5

Milieu de substitution :

Acétate de Na N/2	6 cc. 25
Constante minérale A	5 cc.
Sol. de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ à 5 p. 100	5 cc.
NaOH	Variable
Eau distillée	qs 25 cc.

TABLEAU XXXVII

Voiles de 7 jours à l'étuve à 27°, lavés 24 heures à l'eau distillée.

Ac. acétique initial	187 mg.
pH initial	Variable
Durée de contact	8 et 24 heures

Série	pH initial	Durée en heures	pH final	Récolte en mg.	Ac. acétique final en mg.	Consommation en mg.
I	5,70	8	5,89	160	176	11
		8	5,88	158	175	12
		24	6,89	167	140	47
		24	6,78	172	143	44
II	5,97	8	6,36	157	175	12
		8	6,36	155	176	11
		24	7,08	200	134	53
		24	7,10	198	132	55
III	6,07	8	6,68	159	173	14
		8	6,72	156	172	15
		24	8,08	200	97	90
		24	8,06	204	93	94
IV	6,16	8	7,15	155	174	13
		8	7,08	153	173	14
		24	8,06	150	122	65
		24	8,06	148	130	57

CHAPITRE III. — CONSOMMATION DE L'ACIDE ACETIQUE PAR LE *PENICILLIUM GLAUCUM*

Comme dans les expériences correspondantes avec l'acide lactique l'absorption de l'acide est très précoce et sensiblement proportionnelle au temps. (Tableau XXXVIII). Dans la troisième série (pH initial 7.49) la consommation après 8 heures est presque égale à celle des 24 heures ; comme le pH est monté à 8 après les 8 premières heures, il faut probablement attribuer la faible consommation dans les 16 heures suivantes à l'alcalinité du milieu qui gêne le métabolisme du champignon.

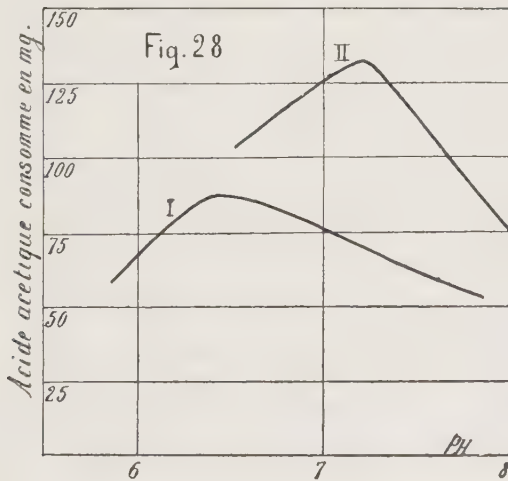


FIGURE 28. — Consommation de l'acide acétique par le *Penicillium glaucum*
en fonction du pH

EXPÉRIENCE XXXVI (Tableau XXXVIII, Figure 28)

Milieu de culture initial :

Milieu de RAULIN dilué au demi .. 50 cc.

Milieu de substitution :

Acétate de Na N/2 6 cc. 25
 Constante minérale A 5 cc.
 Sol. de $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)$ 2 à 5 p. 100 .. 5 cc.
 NaOH Variable
 Eau distillée qs 25 cc.

TABEAU XXXVIII

Voiles de 7 jours à l'étuve à 22°, lavés 24 heures à l'eau distillée.

Ac. acétique initial 187 mg.

pH initial Variable

Durée de contact 8 et 24 heures

Série	pH initial	Durée en heures	pH final	Récolte en mg.	Ac. acétique final en mg.	Consom- mation en mg.
I	5,78	8	6,16	304	124	63
		8	6,08	308	121	66
		24	7,56	331	74	113
		24	7,48	335	78	109
II	6,13	8	6,70	313	97	90
		8	6,65	318	102	85
		24	8,24	330	49	138
		24	8,29	342	60	127
III	7,49	8	8,05	310	130	57
		8	8,07	308	135	52
		24	8,55	270	110	77
		24	8,58	267	115	72

CHAPITRE IV. — CONSOMMATION DE L'ACIDE ACETIQUE PAR LE CUNNINGHAMELLA ECHINULATA

Même avec ce champignon, qui consomme cependant assez mal les acides lactique et oxalique, l'acide acétique est très bien absorbé ; et on note dans les cas les plus favorables (tableau XXXIX, série I et II) une augmentation très nette du poids du mycélium.

La consommation, nettement plus forte dans la série la plus acide, ne s'annule cependant pas lorsque le pH augmente, mais demeure à peu près stationnaire à partir du moment où théoriquement les molécules entières ont disparu du milieu.

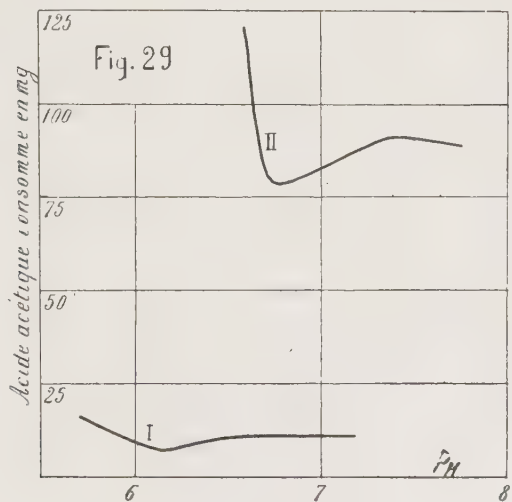


FIGURE 29. — Consommation de l'acide acétique
par le Cunninghamella en fonction du pH

EXPÉRIENCE XXXVII (Tableau XXXIX, Figure 29)

Milieu de culture initial :

Milieu à la carotte de même composition que celui utilisé pour l'*Aspergillus repens*.

Milieu de substitution :

Acétate de Na N/2	6 cc. 25
Constante minérale A	5 cc.
Sol. de SO ₄ (NH ₄) 2 à 5 p. 100 ..	5 cc.
NaOH	Variable
Eau distillée	qs 25 cc.

TABLEAU XXXIX

Voiles de 7 jours à l'étuve à 24°, lavés 24 heures à l'eau distillée.

Ac. acétique initial	187 mg.
pH initial	Variable
Durée de contact	8 et 24 heures

Série	pH initial	Durée en heures	Récolte en mg.	pH final	Ac. acétique final en mg.	Consommation en mg.
I	5,71	8	208	5,88	175	12
		8	206	5,90	172	15
		24	240	7,52	68	119
		24	245	7,48	71	116
II	6,07	8	201	6,20	180	7
		8	204	6,20	180	7
		24	222	7,31	106	81
		24	232	7,36	112	75
III	6,55	8	205	6,49	177	10
		8	206	6,56	176	11
		24	210	8,28	93	94
		24	202	8,16	97	90
IV	6,93	8	203	7,10	175	12
		8	205	7,02	177	10
		24	192	8,36	96	91
		24	200	8,28	99	87

RESUME DE L'ETUDE SUR LA CONSOMMATION DE L'ACIDE ACETIQUE

1°) En présence de NO_3NH_4 comme source d'azote avec l'acétate de Na comme seule source de carbone, j'ai pu mettre en évidence la formation de nitrites qui devient importante à partir de pH 6,2-6,3.

2°) L'acide acétique est absorbé très énergiquement par les quatre champignons utilisés ; mais la courbe de consommation ne suit pas la courbe de dissociation de l'acide.

Pour les organismes peu sensibles à l'action toxique de l'acide acétique, comme *Aspergillus niger* et *Cunninghamella echinulata*, elle forme sensiblement un palier à partir du moment où théoriquement les molécules entières ont disparu du milieu.

Pour les autres la courbe passe par un maximum vers pH 7 à cause de l'action toxique des milieux plus acides.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Nous allons maintenant essayer de dégager les conclusions à tirer de ces expériences. Je suivrai pour cela le plan de ce travail et j'envisagerai successivement le cas des acides oxalique, lactique et acétique.

I. — Acide oxalique

A) AVANTAGES DE LA CULTURE INDIRECTE.

Cette méthode, bien que délicate à manier, dont l'emploi pour des recherches quantitatives fut si souvent critiqué, est cependant la méthode de choix pour ce genre d'études ; et je voudrais en quelques mots en indiquer ici les raisons.

1°) Les traces de milieu initial que conservent les voiles utilisés, ne peuvent avoir d'influence nuisible pour les recherches comme celles qui viennent d'être exposées, puisque les milieux d'étude contiennent eux-mêmes tous ces éléments.

2°) L'imprécision due à l'impossibilité où l'on est de connaître les poids exacts des mycéliums avant expérience n'est qu'apparente ; on peut avec quelques précautions obtenir des voiles de même âge dont les poids sont à peu près identiques, si bien que l'on peut, sans erreur appréciable, considérer les deux facteurs : poids et âge du mycélium, comme des constantes.

En culture directe, au contraire, les mycéliums réagissant sont bien différents au début et à la fin de l'expérience, et les rapports entre le poids du mycélium et le volume du milieu diminue considérablement avec le temps. Comme d'autre part, le développement des voiles est plus ou moins rapide suivant le pH initial du milieu, on arrive à des résultats difficilement comparables entre eux.

3°) Mais l'avantage le plus marqué de la méthode des voiles solides pour des études comparatives avec plusieurs organismes apparaît surtout dans la possibilité d'utiliser des milieux d'études identiques.

B) INFLUENCE DU GLUCOSE SUR LA CONSOMMATION DE L'ACIDE.

Pour les auteurs anciens les acides organiques étaient protégés par une quantité suffisante de sucre, et leur consommation par le champignon était l'indice d'une carence du milieu en source de carbone glucidique.

SAKAMURA, infirmant cette hypothèse, a montré que la consommation de l'acide oxalique par l'*Aspergillus niger* commence alors qu'il reste des quantités importantes de sucre, et que lorsqu'il a disparu la consommation s'arrête si les conditions de pénétration ne sont pas réalisées. En d'autres termes la consommation de l'acide ne dépend pas de la quantité de sucre mais du pH du milieu.

J'ai pu constater le même phénomène avec l'*Aspergillus niger* et les autres champignons utilisés, ce qui semble bien indiquer qu'il est général.

La conception téléologique du choix de ses aliments par le champignon ne peut donc plus être retenue.

Il assimile tout ce qui lui est offert quand bien même il en résulterait des conditions dysgénésiques, et la rapidité de la pénétration de chaque substance est fonction de la perméabilité de la membrane pour chacune d'elle.

J'ai même pu constater avec la culture indirecte que le glucose, loin de protéger l'acide, favorisait, au contraire, son assimilation. Ce comportement, en apparence paradoxal, se conçoit aisément :

En présence de glucose le milieu permet normalement un bon développement du mycélium, il se fait avec le milieu environnant des échanges rapides que nécessite la rapidité de son accroissement, et l'acide qui participe à ces échanges, est absorbé en quelque sorte « par entraînement ». En l'absence de glucose, au contraire, l'acide, seul élément énergétique ne permet qu'un développement médiocre du mycélium ; s'accroissant lentement, il a peu de besoin et l'absorption de l'acide est plus lente.

Ce phénomène, moins net avec les champignons peu exigeants comme l'*Aspergillus niger*, peut aller avec d'autres, comme j'ai pu le constater avec *Cunninghamella echinulata*, jusqu'à la suppression complète de l'absorption.

Cette différence entre l'intensité des échanges n'est d'ailleurs pas la seule cause, car, après quelques heures de contact, vient s'ajouter encore la différence des poids de mycélium réagissant.

C) PÉNÉTRATION DE L'ACIDE.

L'acide oxalique est un mauvais aliment et sa consommation reste toujours faible. Les expériences nous montrent qu'elle est sous la dépendance étroite du pH du milieu, et partant de l'état de dissociation de l'acide.

Il faut remarquer tout d'abord, qu'aucun des quatre champignons utilisés n'est capable d'assimiler les ions oxalate neutre, mais c'est là leur seul lien commun, car les divergences apparaissent au sujet de l'ion oxalate acide.

L'*Aspergillus niger*, dans les conditions normales, ne consomme que les molécules entières, mais peut, dans certaines conditions (lorsque les voiles en expérience ont été épuisés par des lavages à l'eau distillée), assimiler aussi quoique moins rapidement les ions oxalate acide.

L'*Aspergillus repens*, comme le faisaient prévoir les expériences de BACH, assimile normalement les ions oxalate acide.

Le cas du *Penicillium glaucum* est à rapprocher de celui de l'*Aspergillus niger*. Avec un milieu peu favorable au développement du mycélium il ne consomme que les molécules indissociées, dans les autres cas il absorbe également les ions oxalate acide.

Enfin le *Cunninghamella echinulata* ne peut assimiler que les molécules entières.

SAKAMURA avait émis l'hypothèse d'une adaptation particulière des champignons acidophyles à ne consommer que les molécules entières, tandis que les champignons acidophobes seraient mieux en état d'absorber l'acide à l'état d'ions. Cette hypothèse trop finaliste n'est pas vérifiée par mes expériences, puisque *Cunninghamella echinulata*, champignon très sensible aux ions H, n'absorbe cependant que les molécules entières.

Ces expériences avec l'acide oxalique mettent en évidence deux modes de pénétration distincts.

a) Avec *Aspergillus niger* et *Cunninghamella echinulata*, pénétration exclusive dans les conditions normales des molécules non ionisées. Ce fait est en accord avec les conclusions de la plupart des auteurs qui ont étudié la question, et son explication ne souffre aucune difficulté, puisque les molécules peuvent traverser la membrane sans provoquer de déséquilibre de potentiel de part et d'autre de celle-ci.

b) Avec *Aspergillus repens* et *Penicillium glaucum*, les expériences ne permettent de constater que la pénétration des ions oxalate

acide. Mais, quoiqu'on ne puisse la mettre directement en évidence, il est facile de montrer que la pénétration des molécules doit être très importante.

Avec *Aspergillus repens* leur apparition dans le milieu coïncide avec celle d'une toxicité intense : à pH 3 un milieu N/16 en acide oxalique est encore si toxique que tout échange cesse. Cette toxicité n'est imputable ni aux ions H, puisque le mycélium peut se développer jusqu'à pH 1,8 en l'absence de cet acide (BACH), ni aux ions oxalate acide : à pH 3 un milieu N/16 en acide oxalique a une concentration de 2 g. 60 pour 1000 en ions oxalate acide, concentration qui n'est nullement toxique dans mes conditions d'expérience (1). Il ne reste donc à incriminer que la présence des molécules non dissociées ; et leur toxicité très élevée ne peut être due qu'à leur pénétration très rapide.

J'ai montré, d'autre part, que, suivant le milieu de culture initial, le comportement du *Penicillium glaucum* était différent. Avec des voiles poussés normalement on constate la pénétration des ions oxalate acide ; dans des conditions de croissance peu favorables, le champignon n'assimile plus que les molécules entières. Je pense qu'il faut voir dans ce cas une diminution considérable de l'activité des échanges, et que dans les conditions normales la pénétration des ions oxalate acide est accompagnée, lorsque le pH le permet, de la pénétration encore plus rapide des molécules entières puisque cette dernière a subsisté dans les conditions anormales.

Comment, alors, expliquer le comportement de l'*Aspergillus niger* et de *Cunninghamella echinulata* ?

Je pense qu'il est dû à la perméabilité très faible de ces organismes pour l'acide oxalique, qui ne leur permet pas d'assimiler les ions de façon mesurable. Le cas de l'*Aspergillus niger*, qui a été spécialement étudié, vient d'ailleurs fortifier cette conception.

Nous avons vu que la pénétration des ions oxalate acide qui se produit avec des voiles épuisés par des lavages à l'eau distillée, n'existe plus lorsqu'ils ont été lavés la dernière fois avec une solution isotonique avec le milieu de substitution. Il est logique de penser que, dans le premier cas, la différence considérable de pression osmotique entre le contenu cellulaire et le milieu externe, accroît la vitesse

(1) En effet, en se rapportant aux résultats de l'expérience XVII (tableau XVIII, série I), on constate qu'un milieu N/8 en acide oxalique à pH 4 n'est pas toxique pour *Aspergillus repens* ; or, un tel milieu a une concentration de 3 g 75 pour 1000 d'acide à l'état d'ions oxalate acide.

des échanges qui se traduit par la pénétration mesurable des ions oxalate acide. J'ai pu montrer, d'ailleurs, que, même dans ce cas, la pénétration des molécules était beaucoup plus rapide que celle des ions.

Nous arrivons donc à cette conclusion que les ions oxalate acide peuvent pénétrer, mais avec une vitesse bien inférieure à celle des molécules.

Une question se pose maintenant : par quel mode se fait le passage des ions ?

Dans l'état actuel de nos connaissances nous en sommes réduits à formuler des hypothèses.

Le passage des ions oxalate acide, qui doivent être chargés électriquement (1), ne peut se faire que de deux façons : par tendance à l'établissement d'un équilibre de DONNAN, équilibre toujours déplacé dans le même sens par suite de la disparition des ions métabolisés par la cellule ; ou par passage simultané dans le sens dehors-dedans d'ions de signe contraire. Il est impossible pour l'instant de choisir entre l'un ou l'autre de ces moyens qui se traduisent tous deux par un ralentissement considérable des échanges.

II. — Acide lactique

PÉNÉTRATION DE L'ACIDE.

La consommation de l'acide lactique varie en intensité avec chacun des champignons utilisés.

D'une intensité à peu près égale chez l'*Aspergillus niger* et le *Penicillium glaucum*, elle est tardive avec le premier tandis qu'elle est précoce avec le second.

L'*Aspergillus repens* n'assimile pas du tout l'acide lactique.

Nous sommes dans ce cas en face de deux hypothèses :

a) Ou bien l'acide lactique peut pénétrer à l'intérieur de la cellule et ne peut être métabolisé. Par suite de l'accumulation de l'acide la pression à l'intérieur de la cellule devient rapidement telle que les échanges sont supprimés, bien que la quantité d'acide ayant pénétré soit encore trop faible pour pouvoir la déceler au dosage.

b) Ou bien la membrane protoplasmique de l'*Aspergillus repens* est imperméable à l'acide lactique.

(1) Il est toutefois vraisemblable de penser que cet ion oxalate acide, où sur l'anion neutre reste encore accroché un cation doit avoir une charge électrique plus faible que l'ion d'un acide monovalent.

La première hypothèse pose une invraisemblance. Il est difficile de concevoir qu'une molécule aussi répandue que celle de l'acide lactique, forme intermédiaire très commune de l'assimilation des glucides, puisse ainsi échapper à l'action du métabolisme cellulaire. Il faudrait donc admettre qu'elle est toxique, ce qui n'est pas le cas.

La seconde hypothèse tient mieux compte des expériences des prédécesseurs avec cet acide.

J'ai déjà dit que pour BACH la toxicité de l'acide lactique pour *Aspergillus repens* est sensiblement nulle. Pour SMITH, sa toxicité est également nulle sur des œufs d'animaux marins. Comme il est admis maintenant de façon générale, qu'elle est due à l'action des ions H résultant de la dissociation à l'intérieur de la cellule de l'acide qui a pénétré, il est donc logique de penser que l'acide lactique n'a pu pénétrer.

Le *Cunninghamella echinulata*, qui assimile lentement l'acide, forme la transition entre l'*Aspergillus repens* et les premiers.

La consommation, lorsqu'elle existe, est sous la dépendance étroite du pH, et la pénétration des ions lactate, si elle existe, n'excède pas les erreurs d'expériences.

III. — Acide acétique

A) VALEUR ALIMENTAIRE.

Comme le faisaient prévoir les expériences antérieures l'acide acétique est un bon aliment énergétique. Chez tous les champignons utilisés, il s'est montré une source de carbone assez bonne pour produire malgré l'absence de glucose, dans les cas les plus favorables, un accroissement sensible du poids des mycéliums. On assiste même souvent à une véritable continuation de la culture.

B) PÉNÉTRATION DE L'ACIDE.

Avec l'*Aspergillus niger* et *Cunninghamella echinulata*, la consommation qui atteint pour l'*Aspergillus niger* 85 p. 100 de l'acide mis en œuvre, diminue comme la concentration en ions H et comme celle des molécules entières, mais vers pH 7, au moment où, d'après les lois de dissociation électrolytique, le milieu ne devrait plus renfermer de molécules non ionisées, la consommation reste importante, mais sensiblement constante.

Avec *Aspergillus repens* et *Penicillium glaucum*, les courbes sont

encore plus irrégulières, et on note un maximum aux environs de pH 7. La diminution de la consommation du côté acide est due vraisemblablement à la toxicité très grande des molécules entières qui inhibe rapidement les facultés d'assimilation du mycélium.

Le fait que la consommation ne s'annule pas au delà de pH 7, alors que théoriquement les molécules entières ont disparu du milieu, paraît en contradiction avec les résultats des nombreux auteurs qui se sont occupés de l'action de l'acide acétique sur des organismes les plus divers, soit en mesurant sa vitesse de pénétration, soit en étudiant sa toxicité. Ils concluent généralement à la pénétration de la seule molécule entière.

Mais pour l'acide acétique, acide faible, il convient de faire intervenir les faits de la dissociation hydrolytique. L'acétate de soude, sel d'un acide faible et d'une base forte, n'est pas hydrolysé entièrement en solution aqueuse (1). Dans ces conditions, le recul d'ionisation est tel que pratiquement la dissociation n'est jamais complète (2).

Le champignon se trouve donc toujours en présence d'une certaine quantité de molécules non dissociées, qui se reforme aussitôt absorbée en vertu de la loi d'action de masses s'exerçant à la fois sur l'acide et sur l'acétate de soude non hydrolysé.

Il faut ajouter que cela n'exclut pas la possibilité de la pénétration d'une certaine quantité d'ions acétate par un processus analogue à celui décrit par l'acide oxalique.

IV. — Résumé

En résumé, si la pénétration des acides se fait de préférence à l'état de molécules entières, il faut dans certains cas faire intervenir la pénétration des ions. L'hypothèse formulée par OSTERHOUT se

(1) SEYLER C. A. et LYON P. V. (J. Chem. Soc. 1917, t. III, p. 138) donne comme valeur de son coefficient d'hydrolyse $g = 0,64$ en présence de sels à la concentration 0,5 M. SMITH (loc. cit.) prend comme valeur $g = 0,618$ dans l'eau de mer. Dans mes milieux de concentration saline plus forte, il a une valeur inférieure encore.

(2) Ce fait est en somme identique au cas bien connu de la dissociation de CINH_4 . Ce sel donne dans l'eau une solution de pH 5,5 dû à la dissociation plus forte de HCl que de NH_4OH produits par hydrolyse. A ce pH, alors que, d'après sa constante de dissociation, l'ammoniaque devrait être complètement ionisée, on peut mettre en évidence une certaine tension en gaz ammoniac, donc d'ammoniaque à l'état moléculaire.

révèle trop exclusive. En l'admettant intégralement, il serait d'ailleurs difficile d'expliquer la pénétration cependant évidente des sels bien dissociés qui n'existent pratiquement pas à l'état moléculaire.

L'ordre des acides, classés d'après leur vitesse de pénétration est le suivant :

acide acétique, acide lactique, acide oxalique ;

exception faite du cas de l'*Aspergillus repens* avec lequel l'acide lactique prend la dernière place.

Ces expériences ne permettent pas d'apporter une confirmation à l'une ou l'autre des théories de la pénétration dans les cellules ; aussi bien ce n'est pas dans ce sens qu'elles avaient été conduites.

Cependant, les résultats obtenus s'accordent bien avec la théorie de la membrane tamis. Mais il est certain que ce n'est pas le seul mode à considérer, notamment pour expliquer la pénétration extrêmement forte de l'acide acétique, pour laquelle la lipo-solubilité doit jouer un rôle considérable.

RÉSUMÉ GÉNÉRAL

1°) J'ai donné une bibliographie détaillée de l'action des acides organiques sur de très nombreux organismes et les problèmes qu'elle soulève.

2°) J'ai montré, en recherchant une méthode précise de dosage de l'acide lactique, que l'élimination du glucose par l'hydroxyde de cuivre en milieu alcalin amène une perte sensible en acide lactique.

3°) J'ai étudié la consommation en fonction du pH des acides oxalique, lactique et acétique par les champignons suivants :

Aspergillus niger,
Aspergillus repens,
Penicillium glaucum,
Cunninghamella echinulata.

4°) L'emploi de la méthode des voiles solides m'a permis d'établir directement des courbes de consommation de ces acides en fonction du pH.

5°) La pénétration de l'acide oxalique se fait, suivant les champignons, aux dépens des molécules entières seules, ou à l'ensemble de celles-ci et des ions oxalate acide. Les ions oxalate neutre ne sont jamais assimilés.

6°) La pénétration de l'acide lactique se fait aux dépens des molécules entières. La pénétration des ions lactate, si elle existe, n'excède pas les erreurs d'expérience.

7°) D'après les courbes de consommation de l'acide acétique, la pénétration semble se faire aussi bien aux dépens des molécules entières que des ions acétate. J'ai indiqué qu'il était vraisemblable d'imputer ce fait à une dissociation incomplète de l'acide acétique à cette concentration, sans exclure toutefois la possibilité d'une pénétration d'ions oxalate.

8°) J'ai montré sur des milieux nitrates contenant l'acétate de Na comme seule source de carbone, qu'on pouvait déceler une production importante nitrites dès pH 6,2-6,3.

VU, bon à imprimer :
Le Président de la Thèse,
L. LUTZ.

VU :
Le Doyen de la Faculté,
Paul GUÉRIN.

VU et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
S. CHARLETY.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- AMBERT (P.). — 1929. Entraînement des sucres et des polyols par le sulfate de cuivre et la baryte. Contribution à l'étude du carbone indosé de l'urine normale. — *Thèse Fac. Pharm.*, Paris.
- ARTARI. — 1904. *Pringsheim's Jahrbücher für Wissensch. Botanik*, T. XI, p. 593.
- ASPREY (G. F.). — 1933. Studies on Antagonism. The effect of the presence of salts of monovalent, divalent, and trivalent cations on the intake of Calcium and Ammonium Ions by Potato tuber tissue. — *Proc. Roy. Soc.*, T. CXII (B), pp. 451-472.
- AUBEL (E.). — 1920. Le pouvoir stérilisant des acides. — *C. R. Acad. Sciences*, T. CLXX, p. 970.
- AVERY (B. F.) et HASTINGS (A. B.). — 1931. On the gazometric determination of lactic acid in blood. — *Journ. Biol. Chem.*, T. XCIV, p. 273.
- BACH (D.). — 1925. Contribution à l'étude de la nutrition azotée de *Aspergillus repens* de Bary. — *Thèse Doctorat ès Sciences*, Paris.
- BACH (D.). — 1932. Etudes sur les antiseptiques : Mécanisme de l'action antiseptique des acides organiques sur quelques Bactéries. — *Bul. Sciences Pharm.*, T. XXXIX, p. 7 et p. 425.
- BACH (D.). — 1934. De l'emploi des mycéliums de Mucedinées dans les recherches de physiologie végétale. La méthode des voiles solides. — *Bul. Soc. Chim. Biol.*, T. XVI, p. 1708.
- BECKER (C. H.) et HERZOG (R. O.). — 1907. Zur Kenntniss des Geschmacks. — *Zeits. Physiol. Chem.*, T. LII, p. 496.
- BELJERINK. — 1893. Über Oligonihophilen Mikroben. — *Centralbl. für Bakt.*, T. VII, p. 561.
- BÉLÉHRADEK (J.) et SCHWARTZ (F.). — 1928. L'action toxique des acides de la série formique en relation avec l'adaptation de l'organisme. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, T. X, p. 909.
- BELLET (A.). — 1913. Nouvelle méthode de dosage de l'acide lactique. — *J. P. C.*, T. VIII, p. 21.
- BERNHAEUER (D. K.). — 1928. Über die Charakterisierung der Stämme von *Aspergillus niger* auf Grund ihres biochemischen Verhalts. Vergleichende Untersuchungen über die Säurebildung durch verschiedene Pilzstämmen. — *Bioch. Zeits.*, T. CXCVII, p. 278.
- BERNHAEUER (D. K.). — 1932. *Die oxydativen Gärungen*, Berlin, J. Springer.
- BIAL (M.). — 1902. Die antiseptische Funktion des H-Ions verdünnter Säuren. — *Zeits. f. Physik. Chemie*, T. XL, p. 513.
- BLAKESLÉE. — 1905. *Bot. Gazette*, T. XL, n° 3.
- BOAS (F.) et LEBERLE (H.). — 1918. Untersuchungen über Säurebildung bei Pilzen und Hefen. — *Bioch. Zeits.*, T. XCII, p. 170.
- BODENSKY (M.). — 1928. Lipoid solubility, permeability and hemolytic action of the saturated fatty acids. — *Journ. of Biol. Chem.*, T. LXXIX, p. 241.
- BODINE (J. H.). — 1925. Some physiological actions of cyanide. — *Journ. of Gen. Physiol.*, t. VII, p. 19.
- BOKORNY (Th.). — 1896. Notizen zur Kohlenstoff- und Stickstoffernährung der Pilze. — *Chem. Centralb.*, 4 Folge, T. VIII (1), p. 713.
- BOUILLENNE. — 1930. Pénétration des sels ammoniacaux dans les cellules végétales. — *C. R. Soc. Biol.*, T. CIII, p. 50.

- BRAUN (H.) et WORDERHOFF. — 1933. Über die oxydativen und rediezierenden Fermentwirkungen der Ruhr Bazillus Flexner. — *Centabbl. f. Bakt., Série I*, T. CXXVIII, p. 50.
- BRINLEY (F.). — 1927. Penetration of hydrogen cyanide into living cells. — *Protoplasma*, T. II, p. 385.
- BROOKS (M. M.). — 1923. *U. S. Pub. Health Repts*, n° DCCCXLVI, p. 1470.
- BROOKS (M. M.). — 1926. The permeability of protoplasm to ions. — *Am. Journ. of Physiol.*, T. LXXVI, p. 116.
- BROOKS (M. M.). — 1934. Comments on Dr. Keller's communication « Ionen in Protoplasma ». — *Protoplasma*, T. XX, p. 131.
- BRUHNE. — Cité par RAVIN.
- BUTKEWITCH (W.). — 1922. Über die Bildung und Anhäufung der Oxalsäure in den *Citromyces* Kulturen auf den Salzen der organischen Säuren. — *Bioch. Zeits.*, T. CXXIX, p. 464.
- BUTKEWITCH (W.). — 1922. Über den Verbrauch und die Bildung der Citronensäure in den Kulturen von *Citromyces glaber* auf Zucker. — *Bioch. Zeits.*, T. CXXXI, p. 338.
- BUTKEWITCH (W.). — 1923. Über die Bildung der Citronensäure in den Kulturen von *Aspergillus niger* und *Penicillium glaucum* auf Zucker. — *Bioch. Zeits.*, T. CXXXVI, p. 224.
- BUTKEWITCH (W.). — 1923. Über die Citronensäuregärung. — *Bioch. Zeits.*, T. CXLII, p. 195.
- BUTKEWITCH (W.). — 1924. Über die Bildung der Glucon. und Citronensäure in den Pilzkulturen auf Zucker. — *Bioch. Zeits.*, T. CLIV, p. 177.
- CHELLE (L.). — 1914. Dosage chimique des hydrates de carbone et de l'acide lactique dans le sang. — *Bull. Soc. Pharm.*, Bordeaux, T. LIV, p. 193.
- CLARK (W. M.). — 1899. On the toxic effect of deleterious agents on development of certain filamentous fungi. — *Bot. Gazette*, T. XXVIII, p. 239.
- CLARK (M.). — 1922. The determination of hydrogen ions. — Second Edition BALTIMORE.
- CLARK (M.) et LUBS (M.). — 1917. The colorimetric determination of hydrogen ions concentration, and its application in Bacteriology. — *Journ. Bact.*, T. II, pp. 1, 109, 191.
- CLAUSEN (S. W.). — 1922. A method for the determination of small amounts of lactic acid. — *Journ. of Biol. Chem.*, T. LII, p. 263.
- COHEN (B.) et CLARK (W. M.). — 1919. The growth of certain bacteria in media of different ion concentration. — *Journ. of Bact.*, T. IV, p. 409.
- COLLANDER (R.), TURPEINEM (O.) et FABRITIUS (E.). — 1931. Die Permeabilität der Rhoeozellen für Ammoniak und Essigsäure. — *Protoplasma*, T. XIII, p. 348.
- COLLETT (M. E.). — 1919. — The toxicity of acids to ciliate Infusoria. — *Journ. of Exp. Zool.*, T. XXIX, p. 443.
- COLLETT (M. E.). — 1921. The toxicity of acids to Infusoria II Role of molecules and of ions. — *Journ. of Exp. Zool.*, T. XXXIV, p. 67.
- COMPEL (M.). — 1925. Sur la pénétrabilité des acides dans les cellules d'*Ulva lactuca*. — *Annales de Physiol.*, T. I, p. 225.
- COUPIN (H.). — 1927. Sur la nutrition carbonée du *Penicillium glaucum* à l'aide de divers composés de la série grasse. — *C. R. Acad. Sciences*, T. CLXXXIV, p. 1575.
- COUPIN (H.). — 1927. Sur la nutrition carbonée du *Penicillium glaucum* à l'aide de divers composés de la série aromatique. — *C. P. Acad. Sciences*, T. CLXXXV, p. 145.
- COUPIN (H.). — 1928. Sur la nutrition carbonée de *Rhizopus nigricans*. — *C. R. Acad. Sciences*, T. CLXXXVI, p. 251.
- COURTOIS (J.). — 1932. Contribution à l'étude de l'entraînement des sucres et des polyols par les hydroxydes métalliques en milieu alcalin. — *Thèse Doctorat en Pharmacie*, Paris.
- CROWIER (W. J.). — 1916. Cell penetration by acids. — *Science*, T. XLII, p. 735.

- CROZIER (W. J.). — 1916. Cell penetration by acids. — *Journ. of Biol. Chem.*, T. XXIV, p. 255.
- CROZIER (W. J.). — 1916. Cell penetration by acids. Data on some additional acids. — *Journ. of Biol. Chem.*, T. XXVI, p. 225.
- CROZIER (W. J.). — 1918. Sensory activation by acids. — *Amer. Journ. of Physiol.*, T. XLV, p. 323.
- CZAPEK (F.). — 1901. Zur Kenntniss der Stickstoffversorgung und Eiweissbildung bei *Aspergillus niger*. — *Ber. d. deut. bot. Gesell.*, T. XIX, p. 137.
- CZAPEK (F.). — 1913. Biochemie der Pflanzen, 2^e Edition, Iena.
- DALES (D.) et MINES (G. R.). — 1911. The action of acids on skeletal muscle. — *Journ. of Physiol.*, T. XLII, p. XXIX.
- DE BARY (A.). — 1870. Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Pilze, T. III, p. 1.
- DE VRIES (H.). — 1871. Sur la perméabilité du protoplasme des betteraves rouges. — *Arch. Neerland.*, T. VI, p. 117.
- DE VRIES (H.). — 1888. Über den isotonischen Koeffizient des Glycerins. — *Bot. Zeits.*, T. XLVI, p. 226.
- DE VRIES (H.). — 1889. Über die permeabilität der Protoplasma für Harnstoff. — *Bot. Zeits.*, T. XLVII, p. 309.
- DIAKONOW. — 1887. Organischen Substanz als Nährsubstanz. — *Deutsche Bot. Gazette*, T. V, p. 380.
- DUCLAUX. — 1885. Valeur alimentaire de quelques substances pour *Aspergillus niger*. — *C. R. Soc. Biol., Série 8*, T. II, p. 91.
- DUCLAUX. — *Traité de Microbiologie*, T. III, p. 385.
- DUGGAR (B. M.). — 1901. Physiological studies with reference to the germination of certain fungous spores. — *Bot. Gazette*, T. XXXI, p. 38.
- DUNN (M. S.). — 1926. Effects of certain acids and their Na salts upon the growth of *Sclerotinia cinerea*. — *Amer. Journ. of Bot.*, T. XIII (I), p. 40.
- EULER (H.) et HEINTZE (S.). — 1919. Über die pH-Empfindlichkeit der Gärung einer Oberhefe. — *Zeits. für Physiol. Chem.*, T. CVIII, p. 165.
- FISHER (A.). — 1907. Wasserstoff und Hydroxylionen als Keimungsreize. — *Ber. d. deut. bot. Gesells.*, T. XXV, p. 108.
- FLEURY (P.) et AMBERT (P.). — 1930. Etude de la précipitation des sucres et des polyols à l'état de complexe cuprobarytique. — *Bull. Soc. Chim. Fr.*, T. XLVII, p. 420.
- FRIEDEMANN (T. E.), COTTONIO (M.) et SCHAFER (P. A.). — 1927. The determination of lactic acid. — *Journ. of Biol. Chem.*, T. LXXIII, p. 335.
- FURTH (O.) et CHARNASS (D.). — 1910. Über die quantitative Bestimmung der Milchsäure durch Ermittlung der daraus als spaltbaren Aldehydemenge. — *Bioch. Zeits.*, T. XXVI, p. 199.
- FUHRER (H.) et NEUBAUER (E.). — 1907. Hämolyse durch Substanzen homologen Reihen. — *Arch. für experim. Pathol. und Pharmak.*, T. LVI, p. 333.
- GUILLAUMIN (Ch. O.). — 1927. Faits expérimentaux sur la caractérisation et la mesure de l'oxalémie et de l'oxalorachie. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, T. IX, p. 247.
- HAAS (A. R.). — 1916. The permeability of living cells to acids and alkalies. — *Journ. of Biol. Chem.*, T. XXVII, p. 225.
- HÄGGLUND (E.). — 1914. *Sammlung Ahrens. Herz (Stuttgart)*, T. XXI, p. 129.
- HÄGGLUND (E.) et AUGUSTSON (A. M.). — 1925. Über die Abhängigkeit der alkoholischen Gärung von den Wasserstoffionenkonzentration. I. — *Bioch. Zeits.*, T. CLV, p. 334.
- HÄGGLUND (E.) et AUGUSTSON (A. M.). — 1925. Über die Abhängigkeit der alkoholischen Gärung von den Wasserstoffionenkonzentration. II. — *Bioch. Zeits.*, T. CLXVI, p. 234.
- HARVEY (E. N.). — 1911. Studies on the permeability of cells. — *Journ. of Exp. Zool.*, T. X, p. 507.
- HARVEY (E. N.). — 1914. (1) Cell permeability for acids. — *Science*, T. XXXIX, p. 947.
- HARVEY (E. N.). — 1914 (2) The permeability of cells for acids. — *Inter. Z. Phys. Chem. Biol.*, T. I, p. 463.

- HEALD (O.). — 1896. On the toxic effect of dilute solutions of acids and salt upon plants. — *Bot. Gazette*, T. XXII, p. 125.
- HENNEBERG (W.). — 1906. Giftwirkung der Ameisensäure auf verschiedene Pilze. — *Zeits. Spiritusind.*, T. XXIX, p. 3440.
- HILL (S. E.). — 1929. The penetration of Luminous Bacteria by the ammonium salts of the lower fatty acids. — *Journ. of Gen. Physiol.*, T. XII, p. 863.
- HÖBER (R.). — 1924. Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe. — 5^e Edition.
- HÖBER (R.). — 1930. Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe. — 7^e Edition.
- HUGOUNENQ et FORENCE. — 1828. Principe de Pharmacodynamique. — Paris, Masson, édit.
- HURWITZ (S. H.). — 1910. The reactions of earthworms to acids. — *Proceedings of Am. Acad. Arts and Sciences*, T. XLVI, p. 67.
- IRWIN (M.). — 1927. The effect of acetate buffer mixture, acetic acid and Na acetate, on the protoplasm, as influencing the rate of penetration of cresyl blue into the vacuole of *Nitella*. — *Journ. of Gen. Physiol.*, T. XI, p. III.
- JACOBS (M. H.). — 1920. To what extent are the physiological effects of carbon dioxide due to hydrogen ions ? — *Am. Journ. of Physiol.*, T. LI, p. 321.
- JACOBS (M. H.). — 1926-1927. The exange of material between the erythrocyte and its surroundings. — *The HARVEY Lectures*, T. XXII, p. 146.
- JACQUES (C.) et OSTERHOUT (W. J. V.). — 1930. The kinetics of penetration. II The penetration of CO₂ in Valonia. — *Journ. of Gen. Physiol.*, T. XIII, p. 695.
- JANSE (J. M.). — 1887. Plasmolytische Versuche an Algen. — *Bot. Centrabl.*, T. XXXII, p. 21.
- JERUSALEM (E.). — 1908. Über eine neues Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Milchsäure in Organen und tierischen Flüssigkeiten. — *Bioch. Zeits.*, T. XII, p. 361.
- JODIN (M.). — 1862. Etudes de chimie physiologique. — *C. R. Acad. Sciences*, T. LIV, p. 917.
- JOHANNESSEN. — 1912. Einfluss organischer Säuren auf die Hefegärung. — *Bioch. Zeits.*, T. XLVII, p. 97.
- JUCEI (C.). — 1929. Su la permeabilita ad elettroliti del tessuto ciliato di Attinie. — *Arch. Zool. Ital.*, T. XIII, p. 487.
- KAHLENBERG (L.). — 1898. The action of solutions on the sense of taste. — *Bull. Univ. Wisconsin Scien. Ser.*, T. II, n° 1, p. 1.
- KAHLENBERG (L.) et AUSTIN (R.). — 1900. Toxic action of acid Sodium Salts on *Lupinus Albus*. — *Journ. of Physic. Chem.*, T. IV, p. 553.
- KAHLENBERG (L.) et TRUE (R.). — 1896. On the toxic action of dissolved salts and their electrolytic dissociation. — *Bot Gazette*, T. XXII, p. 81.
- KATAGIRI (H.). — 1926. The influence of the fatty acids and their Na salts on alcoholic fermentation by living yeast. — 1 Acetic and formic acids and their Na, K, NH₄ salts. — *Bioch. Journ.*, T. XX, p. 427.
- KAYSER et BOULANGER. — 1898. *Ann. de la brasserie et de la distillerie.*, T. I.
- KELLER (R.). — 1928. Molecule und Ionen in Plasma. — *Bioch. Zeits.*, T. CXCIV, p. 14.
- KELLER (R.). — 1933. Ionen in Protoplasma ? — *Protoplasma.*, T. XIX, p. 52.
- KIESEL (A.). — 1913. Recherches sur l'action de divers acides et sels acides sur le développement de l'*Aspergillus niger*. — *Ann. de l'Institut PASTEUR*, T. XXVII, p. 391.
- KLEBS (G.). — 1887. Beiträge zur Physiologie der Pflanzenzelle. — *Ber. deut. Bot. Gesell.*, T. V, p. 181.
- KLERS (G.). — 1896. Die Bedingungen der Fortpflanzung einigen Algen und Pilzen. — Iena.
- KOSTYCHEW et TSCHESNOKOW. — Cités par TAMYA.

- KOSTYCHEW (S.), et TSWETKOVA (E.). — 1921. Über die Verarbeitung der Nitrats in organische Stickstoffverbindungen durch Schimmelpilze. — *Zeits. für Physiol. Chem.*, T. III, p. 171.
- KRUGER. — 1894. Beiträge zur Kenntniss der Organischen der Saftflusses der Laubbaume. — *Zopfs Beitr. zur Physiol. und Morphol. niederer Organismen*, T. IV, p. 69.
- LABORDE (J.). — 1896. Recherches physiologiques sur une moisissure nouvelle l'*Euriotropis Gayoni*. — *Thès. Doct. ès Sciences*, Paris.
- LAURENT (E.). — 1889. Nutrition hydrocarbonée et formaton de glycogène dans la Levure de bière. — *Ann. Inst. PASTEUR*, T. III, p. 113.
- LE RENARD (A.). — 1909. Essai sur la valeur antitoxique de l'aliment complet et incomplet. — *Journ. de Bot.*, 2^e Série, T. II, p. 169.
- LESAGE. — 1896. Recherches expérimentales sur la germination des spores de *Penicillium glaucum*. — *Ann. Scien. Nat. Bot.*, 8^e Série, T. II.
- L'HERMITE. — 1855. Recherches sur l'endosmose. — *Ann. Chim. Phys.*, T. XLIII, p. 420.
- LILLIE (R. S.). — 1925-26. The activation of Starfish eggs by acids. — *Journ. of Gen. Physiol.*, T. VIII, p. 339.
- LILLIE (R. S.). — 1927. The activation of Starfish eggs by acids. II The action of substituted benzoic acids, and benzoic and salicylic acids as influenced by their salts. — *Journ. of Gen. Physiol.*, T. X, p. 704.
- LINK. — 1900. *Observationes*, p. 17.
- LOEB (J.). — 1908. Chemische Konstitution und physiologische Wirksamkeit der Säuren. — *Bioch. Zeits.*, T. XV, p. 254.
- LOEB (J.). — 1909. Chemische Konstitution und physiologische Wirksamkeit von Alkoholen und Säuren. — *Bioch. Zeits.*, T. XXIII, p. 93.
- LOEB (J.). — 1912. Antagonistic action of electrolyts and permeability of the cell membrane. — *Science*, T. XXXVI, p. 637.
- LOEB (J.). — 1912. The comparative efficiency of weak and strong bases in artificial parthenogenesis. — *Journ. of Exp. Zool.*, T. XIII, p. 577.
- LOEB (J.). — 1913. Artificial parthenogenesis and fertilisation. — Chicago.
- LUTZ (L.). — 1903. Sur le rôle des Alcaloïdes envisagés comme source d'azote pour les végétaux. — *Bull. Soc. Bot. de France*, T. L, p. 118.
- MANGIN (M.). — 1909. Qu'est-ce que l'*Aspergillus glaucus* ? — *Ann. Scien. nat. Bot.*, Série 9, T. X, p. 303.
- MATRUCHOT. — 1903. *Ann. Mycologici*, T. I.
- MEISSMER. — 1901. Studien über des Zäherwerden von Mist und Wein. — *London Jahrb.*, T. XXVII.
- MICHAELIS (L.). — 1914. Die Wasserstoffionenkonzentration, Berlin.
- MOLLIARD (M.). — 1919. Production d'acide citrique par le *Sterigmatocystis nigra*. — *C. R. Acad. Scien.*, T. CLXVIII, p. 360.
- MOLLIARD (M.). — 1920. Influence de la réaction du milieu sur la respiration du *Sterigmatocystis nigra*. — *C. R. Soc. Biol.*, T. LXXXIII, p. 50.
- MOLLIARD (M.). — 1920. Sur les caractères présentés par le *Sterigmatocystis nigra* en présence d'une dose réduite de phosphore. — *C. R. Soc. Biol.*, T. LXXXIII, p. 479.
- MOLLIARD (M.). — 1922. Sur une nouvelle fermentation acide produite par le *Sterigmatocystis nigra*. — *C. R. Acad. Scienc.*, T. CLXXIV, p. 881.
- MOLLIARD (M.). — 1923. Nutrition de la plante. Utilisation des substances ternaires. — Doin, édit., Paris.
- MOLLIARD (M.). — 1924. Influence de la nature des sucres sur la formation des acides organiques par le *Sterigmatocystis nigra* sur des milieux déséquilibrés. — *C. R. Soc. Biol.*, T. XC, p. 1395.
- NAEGELI. — 1880. Der Ernährung chemismus der Niederen Pilzen. — Munich.
- NERNST (W.). — 1890. Ein osmotischer Versuch. — *Zeits. für Phys. Chem.*, T. VI, p. 37.
- NERNST (W.). — 1891. Verteilung eines Stoffes zwischen zwei Lösungsmittel und zwischen Lösungsmittel und Dampfraum. — *Zeits. für Phys. Chem.*, T. VIII, p. 110.
- NORTON (J. F.) et HSU (P. H.). — 1916. The physical chemistry of desinfection. — *Journ. Inf. Dis.*, T. XVIII, p. 180.

- OSTERHOUT (W. J. V.). — 1925-26. Is living protoplasm permeable to ions ? — *Journ. of Gen. Physiol.*, T. VIII, p. 131.
- OSTERHOUT (W. J. V.) et DORGAS (M. J.). — 1926. — The penetration of CO₂ into living protoplasm. — *Journ. of Gen. Physiol.*, T. IX, p. 255.
- OVERTON (E.). — 1895. Über die osmotischen Eigenschaften der lebenden Pflanzen- und Tierzelle. — *Vierteljahrshr. d. Naturf. Ges. in Zurich*, T. XI, p. 159.
- OVERTON (E.). — 1897. Über die osmotischen Eigenschaften der Zelle in ihrer Bedeutung für die Toxikologie und Pharmakologie. — *Vierteljahrshr. d. Naturf. Ges. in Zurich*, T. XLII, p. 383.
- OVERTON (E.). — 1899. Über die allgemeinen osmotischen Eigenschaften der Zelle, ihre vermutlichen Ursachen und ihre Bedeutung für die Physiologie. — *Vierteljahrshr. d. Natur. Ges. in Zurich*, T. XLIV, p. 88.
- OVERTON (E.). — 1900. Studien über der Aufnahme der Anilinfarben durch die lebende Zelle. — *Jahrb. f. Wiss. Bot.*, T. XXXIV, p. 669.
- OVERTON (E.). — 1901. Studien über Narkose. — Iena.
- OVERTON (E.). — 1902. Beiträge zur allgemein Muskel- und Nervenphysiologie. — *Pflügers Arch.*, T. XCII, p. 115.
- PASTEUR. — 1860. Notes relatives au *Penicillium glaucum*. — *C. R. Acad. Sciences*, T. LI, p. 208.
- PASTEUR. — 1860. Recherches sur le mode de nutrition des Mucédinées. — *C. R. Acad. Sciences*, T. LI, p. 709.
- PAUL (Th.), BIRSTEIN (G.) et REUSS (A.). — 1910. Beiträge zur Kinetik der Giftwirkung von gelösten Stoffen. — *Bioch. Zeits.*, T. XXIX, p. 200.
- PAUL (F.) et KRONIG (B.). — 1897. Die chemischen Grundlagen der Lehre von der Giftwirkung und Desinfection. — *Zeits. Hyg. Infectious Kranks*, T. XXV, p. 1.
- PFEFFER (W.). — 1873. Physiologische Untersuchungen. — Leipzig.
- PFEFFER (W.). — 1876. Osmotische Untersuchungen : Studien zur Zellmechanik. — Leipzig.
- PHILIPPSON (M.) et HANNEWART (G.). — 1920. L'action physiologique des acides et leur solubilité dans les lipoides. — *C. R. Soc. Biol.*, T. LXXXIII, p. 1570.
- PURIEWITSCH (K.). — 1912. Untersuchungen über die Eiweiss- Synthese bei niederen Pflanzen. — *Bioch. Zeits.*, T. XXXVIII, p. 1.
- RACIBORSKI. — 1900. Über die Assimilation der Stickstoffverbindungen durch Pilze. — *Bull. Acad. Sc. Cracovie, Clas. Mat. et Natur.*, p. 747.
- RAISTRICK (H.) et CLARK (A.). — 1919. On the mechanism of oxalic acid production by *Aspergillus niger*. — *Bioch. Journ.*, T. XIII, p. 329.
- RAULIN. — 1869. Etudes chimiques sur la végétation. Recherches sur le développement d'une Mucédinée en milieu artificiel. — *Ann. des Scien. Nat.*
- RAVIN (P.). — 1914. Nutrition carbonée des plantes à l'aide des acides organiques libres et combinés. — *Ann. des Sc. Nat. Bot., Série 9*, T. XVIII, p. 290.
- REICHEL (J.). — 1910. Über das Verhalten von *Penicillium glaucum* gegenüber der Essigsäure und ihren Salzen. — *Bioch. Zeits.*, T. XXX, p. 152.
- RICHARDS (Th. W.). — 1898. The relation of the taste of acids to their degree of dissociation. — *Am. Chem. Journ.*, T. XX, p. 121.
- RIPKE (O.). — 1910. Das Verhalten einiger Fungi imperfecti zur organischen Säuren. — *Heidelberg Buch und Kuntsdruckeren Rössler et Herbert*.
- RITTER (G.). — 1911. Ammoniak und Nitrate als Stickstoffquelle für Schimmelpilze. — *Ber. d. deut. bot. Gesell.*, T. XXIX, p. 582.
- RUFZ DE LAVISON (J.). — 1911. Recherches sur la pénétration des sels dans le protoplasma et sur la nature de leur action toxique. — *Ann. Scien. Nat. Bot., Série 9*, T. XIV, p. 97.
- RUHLANG (W.) et HOFFMAN (C.). — 1924. Die Permeabilität von *Beggiotoa mirabilis*. Ein Beitrag zur Ultrafiltertheorie der Protoplasmas. — *Arch. für Wiss. Bot.*, T. I, p. 1.
- SAKAMURA (T.). — 1927. Weitere Studien über die moderierende Rolle der

- organischen Salze und des Phosphats bei der Kultur von *Aspergillus niger*. — *Jap. Journ. of Bot.*, T. III, p. 245.
- SCHLOESING (Th.) et MUNTZ (A.). — 1878. Recherches sur la nitrification par les ferments organisés. — *C. R. Acad. Scien.*, T. LXXXVI, p. 892.
- SCHUKOW (J.). — 1896. Über den Säureverbrauch der Hefen. — *Centralb. für Bakt.*, 2^e partie, T. II, p. 601.
- SCOTT (N. W.). — 1918. The significance of undissociated carbon dioxide in respiration. — *Am. Journ. Physiol.*, T. XLVII, p. 43.
- SCUDDER (H.). — 1914. The electrical conductivity and ionisation constants of organic compounds. — New-York.
- SEIFERT. — 1899. Bericht über die Tätigkeit der K. — *Chem. Phys. Versuch Klosterneuburg*.
- SMITH (H. W.). — 1925. The action of acids on cell division with reference to permeability to anions. — *Am. Journ. Physiol.*, T. LXXII, p. 346.
- SMITH (H. W.) et CLOWES (G. H. A.). — 1924 : The influence of carbon dioxide on the velocity of division of marine eggs. — *Am. Journ. Physiol.*, T. LXVIII, p. 183.
- SOMOGYI (R.). — 1921. Wirkung von Säuren auf die Hefe-Gärung. — *Bioch. Zeits.*, T. CXX, p. 100.
- SÖRENSEN. — 1909. Comptes rendus des travaux du Laboratoire de Carlsberg, 8^e vol., p. 1, Copenhage.
- STEVENS. — 1898. The effect of aqueous solutions upon the germination of Fungus spores. — *Bot. Gaz.*, T. XXVI, p. 377.
- STEWART (D. R.). — 1931. The permeability of the *Arbacia* eggs to ammonium salts. — *Biol. Bull.*, T. LX, p. 171.
- STUTZER. — 1877. Über die Beziehungen zwischen der Chemische Constitution gewisser organischen Verbindungen und ihre physiologische Bedeutung für die Pflanze. — *Landwirth. Versuchstat.*, T. XXI.
- TANAKA (S.) et ENDO (M.). — 1929. Methode zur quantitativen Bestimmung du Milchsäure in den tierischen Flüssigkeiten und gewebe. — *Bioch. Zeits.*, T. CCX, p. 120.
- TAMAYA (H.). — 1928. Studien über die Stoffwechselphysiologie von *Aspergillus orizae*. — *Acta Phytochemica*, T. IV, p. 77.
- TAYLOR (N. W.). — 1928. Acid penetration into living tissues. — *Journ. of Gen. Physiol.*, T. II, p. 207.
- TAYLOR (N. W.). — 1930. The nature of the nerve receptor for the acid taste as indicated by the adsorption of organic acids by fats and proteins. — *Protoplasma*, T. X, p. 98.
- TAYLOR (N. W.), FARHUNG (F. R.) et BEERMAN (R.). — 1930. Quantitative measurements on the acid taste and their bearing on the nature of the nerve receptor. — *Protoplasma*, T. X., p. 84.
- THAXTER. — 1903. *Rhodora*, T. V, p. 97.
- THIEL (A.) et WEIS (F.). — 1920. — The effect of citric acid on the germination of the teleospores of *Puccinia graminis*. — *Phytopath.*, T. X., p. 448.
- THOM (Ch.). — 1930. The *Penicillia*. Baltimore.
- TRAUBE (J.). — 1904. Theorie der Osmose und Narkose. — *Pflugers' Arch.*, T. CV, p. 541.
- TRAUBE (J.). — 1910. Die Theorie des Haftdruckes (Oberflächendruckes) und die Resorptionsvorgänge besonders im Magendarmkanal. — *Bioch. Zeits.*, t. XXIV, p. 323.
- TRAUBE (J.). — 1924. Lipoidtheorie und Oberflächenaktivitätstheorie. — *Bioch. Zeits.*, T. CLIII, p. 358.
- TRAUBE (J.) et SOMOGLYI (R.). — 1921. Zur theorie der Desinfection. — *Bioch. Zeits.*, T. CXX, p. 90.
- TRUE (R. H.). — 1900. The toxic action of a series of acids and their Na salts on *Lupinus albus*. — *Am. Journ. Sc.*, T. IX, p. 183.
- VAN DAM. — 1918. Einfluss der Milchsäure auf die Milchsäuregärung. — *Bioch. Zeits.*, T. LXXXVII, p. 107.
- VAN SLYKE (D. D.). — 1917. Studies on acidosis. VII The determination of -hydroxybutyric acid, acetoacetic acid and acetone in urine. — *Journ. of Biol. Chem.*, T. XXXII, p. 455.
- WATERMAN (H. J.). — 1914. Über einige Faktoren welche die Entwicklung

- von *Penicillium glaucum* beeinflussen. Beiträge zur Kenntnis der Antiseptica und der Narkose. — *Centralbl. für Bakt.* II, T. XLII, p. 639.
- WEHMER. — 1892. Oxalsäures Ammonium als pilzliches Stoffwechselproduct bei Ernährung durch Eiweiss. — *Jahrb. d. Naturhist. Gess. zu Hanover*.
- WENT. — Cité par RAVIN.
- WERTHEIMER (E.). — 1927. Untersuchungen über die Permeabilität einer isolierten überlebenden Membran. (f) Die Permeabilität von Säuren und Basen. — *Protoplasma*, T. II, p. 620.
- WIERINGA (K. T.). — 1930. Quantitative Permeabilitätsbestimmungen. — *Protoplasma*, T. VIII, p. 522.
- WIETH. — 1918. The effects of acids on the growth of *Bacillus coli*. — *Bioch. Journ.*, T. XII, p. 382.
- WINSLOW (C. E. A.) et LOCHRIDGE (J. E. G.). — 1906. The toxic effect of certain acids upon typhoid and colon Bacille in relation to the degree of their dissociation. — *Journ. of Inf. Dis.*, T. III, p. 547.
- WODEHOUSE (R. P.). — 1917. Direct determinations of permeability. — *Journ. Biol. Chem.*, T. XXIX, p. 453.
- WOLF (C. Cr. L.) et HARRIS (J. E. G.). — 1917. Contribution to the biochemistry of pathogenic anaerobies. III the effects of acids on the growth of *Bacillus Welchi* (*B. perfringens*) and *Bacillus sporogenes*. — *Bioch. Journ.*, T. XI, p. 213.
-

TABLE DES MATIÈRES

Introduction	8
Historique	12
Les méthodes d'études	29
1) Les organismes étudiés	29
2) Milieux et méthodes de culture	31
3) Recherches sur la récolte et le milieu de culture	37

PARTIE EXPÉRIMENTALE

PREMIÈRE PARTIE. — <i>Etude de la Consommation de l'acide oxalique</i>	55
--	----

CHAPITRE	I. — Etude de la Consommation de l'acide oxalique par l' <i>Aspergillus niger</i>	59
—	II. — Etude de la Consommation de l'acide oxalique par l' <i>Aspergillus repens</i>	85
—	III. — Etude de la Consommation de l'acide oxalique par le <i>Penicillium glaucum</i>	94
—	IV. — Etude de la Consommation de l'acide oxalique par le <i>Cunninghamella echinulata</i>	105
—	V. — Etude de la Consommation de l'acide oxalique par le <i>Mucor circinelloïdes</i>	108

DEUXIÈME PARTIE. — <i>Etude de la Consommation de l'acide lactique</i>	110
--	-----

CHAPITRE	I. — Consommation de l'acide lactique par l' <i>Aspergillus niger</i>	112
—	II. — Consommation de l'acide lactique par l' <i>Aspergillus repens</i>	115
—	III. — Consommation de l'acide lactique par le <i>Penicillium glaucum</i>	117
—	IV. — Consommation de l'acide lactique par le <i>Cunninghamella echinulata</i>	119

TROISIÈME PARTIE. — <i>Etude de la Consommation de l'acide acétique</i>	122
CHAPITRE I. — Consommation de l'acide acétique par l' <i>Aspergillus niger</i>	126
— II. — Consommation de l'acide acétique par l' <i>Aspergillus repens</i>	129
— III. — Consommation de l'acide acétique par le <i>Penicillium glaucum</i>	131
— IV. — Consommation de l'acide acétique par le <i>Cunninghamella echinulata</i>	133
Conclusions générales	136
Résumé général	144
Index bibliographique	145
